



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DOUGLAS GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS
VISANDO AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E
TOXICOLÓGICA DE ARROZ**

SALVADOR – BA

DEZEMBRO DE 2012

DOUGLAS GONÇALVES DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS
VISANDO AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E
TOXICOLÓGICA DE ARROZ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira

Universidade Federal da Bahia – Brasil

Salvador – Ba

Dezembro de 2012

*Aos meus amados pais Saul e Madalena,
que nunca mediram esforços na busca pela melhor educação aos filhos.*

Às minhas queridas irmãs Doane e Débora, pelo cuidado e amor.

Pela felicidade em ter uma família tão especial!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste período de doutorado, várias foram as pessoas que me apoiaram e compartilharam dos meus sentimentos. Todas elas deixaram as suas marcas e, sem dúvida, ajudaram-me a crescer como pessoa. Não posso apresentar este trabalho como completo sem antes lhes agradecer pelo quanto me ajudaram.

Aos meus pais, a minha força para lutar e vencer cada batalha. A vocês eu devo tudo o que sou. Agradeço por sempre acreditarem em mim e se doarem por completo para que eu consiga realizar projetos como este. É sempre muito difícil estar distante geograficamente de vocês.

Às minhas irmãs, obrigado por estarem a todo o momento ao meu lado, vibrando e torcendo por mim. É imensurável o valor que têm na minha vida. Amo muito vocês!

Ao Professor Sérgio Luis Costa Ferreira, pelo exemplo de ser humano e profissional. Obrigado por todas as oportunidades que me deste e, além disso, pela brilhante orientação durante a realização deste trabalho. Agradeço pela paciência, disponibilidade, apoio e entusiasmo em todos os aspectos referentes ao desenvolvimento desta tese. Com você dei as melhores risadas e adquiri grandes ensinamentos sobre a vida. Obrigado por sua amizade e seu acolhimento. Sinto-me privilegiado por ter integrado a sua equipe.

Um agradecimento especial aos amigos do Grupo de Pesquisa em Química e Quimiometria, Jeane, Débora, Adriana, Robson, Rogete, Arlene, Ivanice, Augusto, Alex, aos professores Walter, Ana Pinto e Neyla pelo companheirismo.

À Lai, pela amizade conquistada. Obrigado pela cumplicidade, pela partilha de preocupações, anseios e alegrias. Obrigado pelo carinho, pela força, ânimo e pela amizade que se manterá, mesmo quando nossos caminhos se separarem.

À Fernandinha e a Geraldo, por demonstrarem ser verdadeiros amigos e pela ajuda permanentemente disponibilizada. Vocês foram essenciais na concretização deste trabalho.

A Mário e a Danilo pelo apoio constante, amizade e momentos de descontração.

A Jhow, pelo carinho e preocupação sempre demonstrados e pela grandiosidade do seu coração.

A Uenderson, grande exemplo de força e dedicação, obrigado pelo carinho e pela amizade gerada.

Aos também colegas de laboratório: Geysa, Tiago e Gabriel. Obrigado pela ajuda e também momentos de descontração.

Aos amigos da UIB em Palma de Mallorca, por terem sido tão receptivos e acolhedores nos meses de meu estágio na Espanha, em especial ao Prof. Dr. Víctor Cerdá e a Laura pela atenção, dedicação e excelente co-orientação.

À Lindomar, por tudo o que fez por mim durante a minha estadia em Palma de Mallorca. É um ser humano com um coração grandioso. Peço a Deus para abençoar a sua vida. Você merece o que existe de melhor neste nosso mundo.

A Nai, minha grande amiga e companheira incansável desde a graduação. Agradeço muito a Deus por ter tido o privilégio de tornar-me seu amigo. Obrigado por toda ajuda prestada durante a realização desse trabalho, por sempre me apoiar e mostrar-se solidária. Você é muito valiosa para mim!

A Driquita e Olindinha, pela amizade verdadeira e sólida, pelo convívio diário, por compartilhar das nossas vidas, nossos sonhos, nossos medos, nossos erros. Vocês me fazem sorrir, quando partilham das suas brincadeiras. Fazem-me rir quando contam suas histórias. Fazem-me sentir sozinho quando não estão presentes.

Ao Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos, por ter me apresentado à Química Analítica. Agradeço pelas oportunidades e ensinamentos oferecidos desde a graduação e pela amizade que se construiu ao longo desses anos.

À Charlize e Cristovão pelo atendimento cordial e competente oferecido durante minha permanência na Pós-Graduação.

Ao CNPq por acreditar no presente projeto e pelo auxílio financeiro fornecido durante o seu desenvolvido.

Obrigado meu Deus, por sempre ter guiado meus passos rumo aos caminhos mais seguros da vida e pela oportunidade de realizar este trabalho. “Não sou nada, eu bem sei, tão pequeno, um grão de areia em Suas mãos”.

*“Que Deus me conceda
a serenidade de aceitar as coisas que não posso mudar
a coragem para mudar as coisas que posso mudar
e a sabedoria para distinguir a diferença.”*

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas estratégias analíticas visando a determinação de espécies metálicas em amostras de arroz utilizando procedimento de digestão ácida em micro-ondas e em bloco digestor para o preparo das amostras. Na primeira parte deste trabalho desenvolveu-se um sistema automático para determinação de mercúrio em amostras de arroz empregando injeção em fluxo com multiseringa (MSFIA) e detecção por fluorescência atômica com vapor frio (CV-AFS). Inicialmente, empregou-se o planejamento fatorial completo para avaliação preliminar das variáveis que afetavam o sistema. Em seguida, o planejamento Doehlert foi utilizado com o objetivo de se obter condições ótimas (SnCl_2 3% (m/v) em HCl 2%; vazão da amostra 3 mL min^{-1} e HNO_3 8% (v/v)). O LD e LQ foram iguais a 0,48 e $1,61 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. O desvio padrão relativo foi menor que 2% para uma amostra com concentração de mercúrio igual a $3,63 \text{ ng g}^{-1}$. As concentrações de mercúrio encontradas nas amostras de arroz variaram na faixa de 2,15 a $7,25 \text{ ng g}^{-1}$. Na segunda parte deste trabalho foi proposto um procedimento simples, eficiente e reproduzível para a determinação de cádmio em amostras de arroz por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite empregando modificação química permanente com $400 \mu\text{g}$ de alumínio. Os experimentos foram realizados utilizando-se tubo de grafite com plataforma integrada e aquecimento transversal. Para avaliação da modificação permanente, foram realizados experimentos na ausência e na presença de modificação química convencional com paládio e fosfato de amônio. O programa de temperatura do forno de grafite para a determinação de cádmio foi otimizado para cada tipo de modificador permanente a fim de avaliar a sensibilidade por meio das curvas de pirólise e atomização. A temperatura ótima de pirólise e atomização obtidas foram de 400 e $1800 \text{ }^\circ\text{C}$ uma vez que nestas temperaturas os níveis de fundo apresentaram-se baixo, não sendo observada perda de sensibilidade. A massa característica (m_0) e o LD do método foram $1,32 \text{ pg}$ e $1,8 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente, e a vida útil do tubo de grafite foi de 1080 queimas. O desvio padrão relativo foi igual a 1,67 %, demonstrando uma boa precisão do método. As características analíticas foram comparadas com os métodos recomendados na literatura. No terceiro trabalho avaliou-se a composição mineral de Ca, K, Mg, Na, Zn, Fe, Mn, Sr e Zn em arroz integral, parboilizado e amostras de arroz branco usando ICP OES. O efeito do cozimento no conteúdo mineral também foi investigado. Todos os dados obtidos foram avaliados utilizando as técnicas de análise multivariada PCA e HCA. O procedimento avaliado apresentou uma boa exatidão, evidenciada pela análise de material certificado. Foram alcançados baixos limites de detecção e quantificação e coeficientes de correlação maiores que 0,999.

Palavras-chave: arroz, mercúrio, MSFIA-CV-AFS, cádmio, GF AAS, alumínio, modificador permanente, ICP OES, PCA, HCA, macronutrientes e micronutrientes.

ABSTRACT

In this work, strategies analytical were developed aiming determination of metallic species in rice samples using acid digestion procedure in microwave and block digester for preparation of the samples. In the first part of this work we developed an automated system for determination of mercury in rice samples using flow injection with multiseringa (MSFIA) and detection by cold vapor atomic fluorescence (CV-AFS). Initially, we used a full factorial design for preliminary evaluation of the variables affecting the system. Then, the planning Doehlert was used in order to obtain optimal conditions (SnCl_2 3% (w / v) in 2% HCl, sample flow 3 mL min^{-1} and HNO_3 8% (v / v)). The LD and LQ were equal to 0.48 and 1.61 ng g^{-1} , respectively. The relative standard deviation was less than 2% for a sample with a mercury concentration of 3.63 ng g^{-1} . The mercury concentrations found in samples of rice in a range from 2.15 to 7.25 ng g^{-1} . In the second part of this work we propose a simple, efficient and reproducible for the determination of cadmium in rice samples by atomic absorption spectrometry with graphite furnace employing permanent chemical modification with 400 mg of aluminum. The experiments were performed using graphite tube with integrated platform and cross warming. For evaluation of permanent modification, experiments were performed in the absence and presence of conventional chemical modification with palladium and ammonium phosphate. The temperature program graphite furnace for the determination of cadmium was optimized for each type of permanent modifier to assess the sensitivity curves by means of pyrolysis and atomization. The optimum temperature pyrolysis and atomization obtained were 400 and $1800 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatures since these background levels are presented below, with no observed loss of sensitivity. The characteristic mass (mo) and LD method were 1.32 pg and 1.8 ng g^{-1} respectively and lifetime of the graphite tube was 1080 firings. The relative standard deviation was equal to 1.67%, showing a good accuracy of the method. The analytical characteristics were compared with the methods recommended in the literature. In the third study evaluated the mineral composition of Ca, K, Mg, Na, Zn, Fe, Mn, Sr and Zn in brown rice, parboiled and white rice samples using ICP OES. The effect of cooking on the mineral content was also investigated. All data were evaluated using multivariate analysis PCA and HCA. The procedure evaluated showed good accuracy, as evidenced by the analysis of certified material. Were achieved low limits of detection and quantification and correlation coefficients greater than 0.999.

Keywords: rice, mercury, MSFIA-CV-AFS, cadmium, GF AAS, aluminum, permanent modifier, ICP OES, PCA, HCA, macronutrients and micronutrients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação esquemática da estrutura do grão de arroz.....	07
Figura 2.1: Módulo de multiseringas utilizado para o sistema MSFIA.....	19
Figura 2.2: Representação das válvulas solenóides acopladas na parte superior de cada seringa. (a) válvula solenóide ativada: posição 'on'; (b) válvula solenóide desativada: posição 'off'.....	20
Figura 2.3: Espectrômetro de fluorescência atômica de mercúrio.....	22
Figura 2.4: Painel de controle de conexão de conexões do programa AutoAnalysis.....	23
Figura 2.5: Painel de edição dos métodos analíticos do programa AutoAnalysis.....	24
Figura 2.6: Sistema MSFIA-CV-AFS para determinação de mercúrio.SC: Bobina da amostra; GL: Separador gás-líquido; RC: Bobina de reação; MP: Micro bomba; SV: Válvula solenóide; SGC: Bobina de geração do <i>spray</i> ; PC: Computador; GD: membrana higroscópica <i>Perma Pure</i>	29
Figura 2.7: Esquema da membrana permeável.....	30
Figura 2.8: Diagrama de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas no sistema MSFIA-CV-AFS.....	35
Figura 2.9: Gráfico das médias marginais para o efeito de interação cloreto estanhoso e vazão da amostra para um nível de confiança de 95%.....	37
Figura 2.10: Superfície de resposta para o planejamento Doehlert.....	40
Figura 2.11: Efeito do sinal analítico em diferentes comprimentos do tubo reacional.....	43
Figura 2.12: Curvas analíticas de calibração por meio de (-●-) adição do analito e em (-■-) solução aquosa para determinação de mercúrio em amostra de arroz.....	45
Figura 2.13: Diagrama de Pareto para avaliação da robustez a 20% de modificação dos valores nominais.....	53
Figura 3.1: Bloco Digestor utilizado na digestão de amostras de arroz.....	71

Figura 3.2: Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores selecionados na determinação de cádmio por ET AAS.....	78
Figura 3.3: Gráfico de médias marginais para o a interação temperatura de atomização <i>versus</i> o tempo de pirólise.....	80
Figura 3.4: Gráfico de médias marginais para o a interação temperatura de atomização <i>versus</i> temperatura de pirólise.....	80
Figura 3.5: Efeito de crescentes massas de alumínio depositadas no tubo de grafite sobre a absorvância integrada.....	83
Figura 3.6: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1500 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 400 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para cádmio em 20 μL de amostra de arroz digerida em HNO_3 sem a presença de modificador químico.....	86
Figura 3.7: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1500 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 400 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para cádmio em 20 μL de amostra de arroz digerida em HNO_3 utilizando o alumínio como modificador químico permanente.....	87
Figura 3.8: Perfil do sinal de absorção atômica (AA) e de absorção de fundo (BG) observados para a determinação de cádmio em amostra de arroz em HNO_3 0,5% (v/v) com plataforma revestida termicamente com alumínio. Temperatura de pirólise e de atomização iguais a 400 $^{\circ}\text{C}$ e 1800 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.....	88
Figura 3.9: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1800 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 600 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para cádmio em 20 μL de amostra digerida em HNO_3 utilizado fosfato de amônio como modificador químico.....	89
Figura 3.10: Perfil do sinal de absorção atômica e de absorção de fundo observados para a determinação de cádmio em amostra de arroz em HNO_3 0,5% (v/v) com co-injeção de 5 μg de fosfato de amônio. Temperatura de pirólise e de atomização iguais a 600 $^{\circ}\text{C}$ e 1800 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.....	90
Figura 3.11: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1800 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 600 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para cádmio em 20 μL de amostra de arroz digerida em HNO_3 utilizado o paládio como modificador químico permanente.	91

Figura 3.12: Perfil do sinal de absorção atômica e de absorção de fundo observados para a determinação de cádmio em amostra de arroz em HNO ₃ 0,5% (v/v) utilizando o paládio com modificador químico. Temperatura de pirólise e de atomização iguais a 500 °C e 1600 °C, respectivamente.....	92
Figura 3.13: Comparação entre as curvas de temperatura de pirólise e atomização para a determinação de cádmio em amostras de arroz, submetidos a três tipos de modificadores químicos: (-■-) alumínio, (-○-) fosfato de amônio, (-●-) paládio e (-▲-) ausência de modificador químico.....	93
Figura 3.14: Curvas analíticas de calibração para determinação de cádmio em amostras de arroz na presença de alumínio como modificador permanente: (-■-) Solução aquosa (calibração externa) e (-●-) Adição do analito.....	96
Figura 4.1: Representação das formas de visualização dos resultados de uma análise exploratória dos dados pela análise de agrupamento hierárquico (A) e análise por componentes principais (B), sendo X e Y duas categorias de amostras.....	120
Figura 4.2: Representação da forma de visualização dos resultados de uma análise por componentes principais.	123
Figura 4.3: Representação de um gráfico de <i>scores</i> e seu respectivo gráfico de <i>loadings</i>	125
Figura 4.4: Gráfico de <i>scores</i> correspondentes à classificação das amostras de arroz (branco, parbolizado e integral), entre cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).....	150
Figura 4.5: Gráfico de <i>escores</i> correspondentes à classificação das amostras de arroz integral, entre cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).....	151
Figura 4.6: Dendograma correspondente à classificação de amostras de arroz integral; R: amostras de arroz cru; C: amostras de arroz cozido.....	152
Figura 4.7: Gráfico de <i>escores</i> correspondentes à classificação das amostras de arroz branco: cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).	153

Figura 4.8: Dendograma correspondente à classificação de amostras de arroz branco; R: amostras de arroz cru; C: amostras de arroz cozido.....	154
Figura 4.9: Gráfico de <i>scores</i> correspondentes à classificação das amostras de arroz parbolizado, entre cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).	155
Figura 4.10: Dendograma correspondente à classificação de amostras de arroz parboilizado; R: amostras de arroz cru; C: amostras de arroz cozido.....	156
Figura 4.11: Concentração média (mg kg^{-1}) dos macronutrientes determinados em amostras de arroz integral (■), parboilizado (■) e branco (■).....	160
Figura 4.12: Concentração média (mg kg^{-1}) dos micronutrientes determinados em amostras de arroz integral (■), parboilizado (■) e branco (■)	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Programa de aquecimento para a digestão da amostra em forno microondas.....	26
Tabela 2.2: Parâmetros característicos do sistema MSFIA-CV-AFS.....	31
Tabela 2.3: Níveis das variáveis no planejamento fatorial 2^3	33
Tabela 2.4: Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis para determinação de mercúrio e amostras de arroz com valores reais e codificados.....	33
Tabela 2.5: Tabela da ANOVA dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 4.....	34
Tabela 2.6: Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.....	36
Tabela 2.7: Matriz Doehlert para a otimização final das concentrações de HNO_3 e SnCl_2	39
Tabela 2.8: Tabela da ANOVA dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 2.7.....	40
Tabela 2.9: Condições experimentais empregadas para determinação de mercúrio em amostras de arroz por CV-AFS-MSFIA.....	42
Tabela 2.10: Inclinação das curvas analíticas ($L \mu\text{g}^{-1} \pm s$).....	45
Tabela 2.11: Limites de detecção e quantificação para determinação de mercúrio por MSFIA-CV-AFS.....	47
Tabela 2.12: Determinação de mercúrio total em material certificado ($n=3$)....	50
Tabela 2.13: Teste de adição e recuperação de mercúrio em amostras de arroz ($n = 3$).....	50
Tabela 2.14: Níveis das variáveis experimentais para o estudo da robustez a 20% de modificação.....	51
Tabela 2.15: Matriz do planejamento fatorial completo (2^2) com valores reais e codificados.....	52

Tabela 2.16: Determinação de mercúrio em amostras de arroz por MSFIA-CV-AFS (n=3). P: arroz parboilizado; W: arroz branco.....	54
Tabela 3.1: Programa de temperatura para deposição do alumínio como modificador na plataforma de grafite.....	73
Tabela 3.2: Programa de temperatura usado para determinação de cádmio; uma taxa de fluxo interno de gás de 2,0 L min ⁻¹ foi utilizada em todas as fases, exceto durante a atomização, quando o fluxo de gás foi desligado.....	75
Tabela 3.3: Matriz e resultados do planejamento fatorial completo (2 ³) para avaliação preliminar do alumínio como modificador químico.....	77
Tabela 3.4: Tabela da ANOVA dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 3.3.....	78
Tabela 3.5: Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.....	79
Tabela 3.6: Inclinação das curvas analíticas (L µg ⁻¹ ± s).....	95
Tabela 3.7: Características analíticas para a determinação de cádmio por ET AAS empregando diferentes modificadores permanentes.....	99
Tabela 3.8: Determinação de cádmio em material certificado (n=3).....	100
Tabela 3.9: Parâmetros analíticos obtidos para o procedimento de determinação de cádmio em amostras de arroz.....	101
Tabela 3.10: Concentração de cádmio em amostras de arroz cru adquiridas em supermercados da cidade de Salvador-Ba. ^{a,b}	103
Tabela 3.11: Concentração de cádmio nas amostras cozidas com e sem lavagem.....	110
Tabela 4.1: Artigos publicados sobre aplicação de PCA durante os 25 anos que seguiram a publicação do artigo de Hotelling.....	122
Tabela 4.2: Condições experimentais utilizadas no ICP OES.....	136
Tabela 4.3: Comprimentos de onda empregados para a análise de amostras de alimentos.....	137

Tabela 4.4: Coeficientes de correlação e faixa dinâmica obtidas a partir do método desenvolvido para determinação do metais por ICP OES.....	140
Tabela 4.5: Limites de detecção e quantificação para determinação das espécies metálicas por ICP OES.....	141
Tabela 4.6: Concentrações dos elementos presente no material de referência certificado de farinha de arroz NIST 1568a.....	141
Tabela 4.7: Composição mineral do arroz integral cru e cozido (mg kg^{-1}); B – Integral; R - cru; C – cozido.....	143
Tabela 4.8: Composição mineral do arroz branco cru e cozido (mg kg^{-1}); W – branco; R - cru; C cozido.....	145
Tabela 4.9: Composição mineral do arroz parboilizado cru e cozido (mg kg^{-1}); P: parboilizado; R: cru; C: cozido.....	147
Tabela 4.10: Composição mineral do arroz integral, branco e parboilizado para amostras cruas (mg Kg^{-1}).....	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica (<i>Atomic fluorescence spectrometry</i>)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CRM	Material de referência certificado (<i>Certified Reference Material</i>)
CV	Vapor frio (<i>Cold Vapor</i>)
CV AFS	Espectrometria de Fluorescência Atômica com Vapor Frio (<i>Cold vapor atomic fluorescence spectrometry</i>)
CV HR-CS AAS	Espectrometria de Absorção Atômica de Fonte Contínua e Alta Resolução com Vapor Frio (<i>Cold Vapor High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ET AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (<i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAO	Organização de Alimentos e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FIA	Análise por injeção em fluxo (<i>Flow injection analysis</i>)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HCA	Análise hierárquica de dados (<i>Hierarchical cluster analysis</i>)
HPLC-ICP-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (<i>High Resolution Liquid Chromatography with inductively coupled plasma</i>)

IF	Intensidade de fluorescência
IARC	Agência internacional para a pesquisa do câncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ICP MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KNN	Método dos vizinhos mais próximos (<i>K-Nearest neighbor</i>)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCFIA	Análise por injeção em fluxo com multicomutação (<i>Multicommutated flow analysis</i>)
MPS	Sistemas multibombas
MSFIA	Análise por injeção em fluxo com multiseringa (<i>Multisyringe flow injection analysis</i>)
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (<i>National Institute of Standards e Technology</i>)
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal componente analysis</i>)
PTFE	Politetrafluoretileno (teflon)
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
RSD	Desvio Padrão Relativo (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SIA	Análise por injeção sequencial (<i>Sequential injection analysis</i>)

SIMCA	Modelagem independente de classes (<i>Soft independent modelling of class analogy</i>)
STPF	Forno com plataforma e temperatura estabilizada (<i>Stabilized temperature plataform furnace</i>)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A importância da análise de alimentos.....	02
1.1.1 Macro, micro e elementos tóxicos em alimentos.....	03
1.2 Arroz	05
1.2.1 Produção e consumo de arroz.....	05
1.2.2 Estrutura do grão de arroz.....	06
1.2.3 Beneficiamento do grão de arroz.....	08

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM AMOSTRAS DE ARROZ POR MSFIA-CV-AFS

2.1 Introdução.....	11
2.2 Fundamentação teórica.....	13
2.2.1 O mercúrio.....	13
2.2.2 A importância da determinação de mercúrio em arroz.....	14
2.2.3 Métodos de análise em fluxo.....	16
2.3 Objetivos.....	18
2.3.1 Objetivo Geral.....	18
2.3.2 Objetivos Específicos.....	18
2.4 Parte Experimental.....	19
2.4.1 Sistema de análise em fluxo.....	19
2.4.2 Sistema de detecção.....	21
2.4.2 Software.....	22
2.4.3 Reagentes e soluções.....	24
2.4.4 Amostras.....	25
2.4.5.1 Preparo da amostra empregando decomposição em forno de micro-ondas.....	26
2.4.6 Estratégia de otimização.....	27
2.4.7 Calibração.....	27
2.4.8 Procedimento analítico.....	28
2.4.9 Validação analítica.....	31

2.5 Resultados e Discussão.....	32
2.5.1 Otimização das condições experimentais para a determinação de mercúrio por MSFIA-CV-AFS.....	32
2.5.2 Planejamento fatorial completo.....	32
2.5.3 Otimização usando o planejamento Doehlert.....	38
2.5.4 Montagem do sistema MSFIA e otimização do tubo reacional.....	42
2.5.5 Características analíticas.....	44
2.5.5.1 Avaliação do efeito de matriz e escolha da técnica de calibração....	44
2.5.5.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	46
2.5.5.3 Linearidade.....	47
2.5.5.4 Precisão.....	48
2.5.5.5 Exatidão.....	49
2.5.5.6 Robustez.....	51
2.5.6 Aplicação do método proposto.....	53
2.5.7 Considerações parciais.....	55

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM ARROZ POR ESPECTROMETRIA DE ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA USANDO ALUMÍNIO COMO MODIFICADOR PERMANENTE

3.1 Introdução.....	57
3.2 Objetivos.....	59
3.2.1 Objetivo Geral.....	59
3.2.2 Objetivos Específicos.....	59
3.3 Fundamentação teórica.....	60
3.3.1 O elemento químico cádmio.....	60
3.3.1.1 Ocorrência e usos.....	60
3.3.1.2 Exposição humana.....	60
3.3.2 Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.....	63
3.3.2.1 Modificadores químicos.....	64
3.3.2.1.1 Modificadores químicos convencionais.....	66
3.3.2.1.2 Modificadores químicos permanentes.....	67
3.4 Parte experimental.....	69
3.4.1 Equipamentos e acessórios.....	69
3.4.2 Reagentes.....	69
3.4.3 Descontaminação e armazenagem dos materiais.....	70

3.4.4 Amostras.....	70
3.4.4.1 Preparo das amostras de arroz.....	71
3.4.4.1.1 Cocção em forno micro-ondas.....	72
3.4.5 Uso do alumínio como modificador químicos.....	72
3.4.5.1 Revestimento da superfície gráfica utilizando o alumínio como modificador permanente.....	72
3.4.5.2 Estudo comparativo do alumínio com outros modificadores químicos.....	73
3.4.5.2.1 Modificador de paládio.....	73
3.4.5.2.2 Modificador de fosfato de amônio.....	74
3.4.5.2.3 Programa de aquecimento do forno de grafite: construção das curvas de temperatura de pirólise e atomização.....	74
3.5 Resultados e Discussão.....	76
3.5.1 Avaliação preliminar do alumínio como modificador químico.....	76
3.5.2 Preparo do alumínio como modificador permanente.....	81
3.5.3 Estudo do comportamento eletrotérmico: construção das curvas de temperatura de pirólise e atomização.....	84
3.5.3.1 Ausência de modificador químico.....	85
3.5.3.2 Emprego do alumínio como modificador químico.....	86
3.5.3.3 Emprego do fosfato de amônio e paládio como modificadores químicos: um estudo comparativo.....	88
3.5.4 Avaliação do desgaste da plataforma de grafite.....	93
3.5.5 Avaliação do efeito de matriz e escolha da técnica de calibração.....	94
3.5.6 Validação do método.....	96
3.5.7 Aplicação do método proposto.....	102
3.5.7.1 Determinação de cádmio em amostras de arroz.....	102
3.5.7.2 Avaliação do conteúdo de cádmio após lavagem e cocção.....	109
3.5.8 Considerações parciais.....	122

CAPÍTULO IV

USO DE FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS NA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DE AMOSTRAS DE ARROZ

4.1 Introdução.....	114
4.2 Quimiometria.....	116
4.2.1 Análise exploratória dos dados.....	118
4.2.1.1 Análise de agrupamento por método hierárquicos (HCA).....	119
4.2.1.2 Análise por componentes principais (PCA).....	121

4.2.1.2.1 Breve histórico.....	121
4.2.1.2.2 Definição de componentes principais.....	122
4.2.1.2.3 Análise dos gráficos de influências (loadings)	124
4.2.2 Classificação de amostras ou reconhecimento de padrões.....	125
4.3 Aplicações da análise multivariada em amostras de alimentos.....	128
4.4 Objetivos.....	135
4.4.1 Objetivo Geral.....	135
4.4.2 Objetivos Específicos.....	135
4.5 Parte experimental.....	136
4.5.1 Análise por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).....	136
4.5.2 Materiais e reagentes.....	137
4.5.3 Amostras.....	138
4.5.3.1 Preparo das amostras utilizando bloco digestor/dedo frio.....	138
4.5.3.2 Cocção em forno micro-ondas.....	139
4.6 Resultados e Discussão.....	140
4.6.1 Validação do procedimento proposto.....	140
4.6.2 Determinação da composição mineral do arroz usando ICP OES.....	142
4.6.3 Avaliação dos dados empregando análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de dados (HCA).....	142
4.6.3.1 Análise multivariada aplicada às amostras de arroz integral.....	150
4.6.3.2 Análise multivariada aplicada às amostras de arroz branco.....	152
4.6.3.3 Análise multivariada aplicada às amostras de arroz parboilizado.....	154
4.6.4 Concentração mineral determinada nas amostras de arroz.....	156
4.7 Considerações parciais.....	161
CAPÍTULO V	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165

- **Introdução Geral**

1.1 A IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE ALIMENTOS

As descobertas científicas oriundas do desenvolvimento tecnológico vêm aprimorando a qualidade dos alimentos e aumentando grandemente a capacidade de utilizar informações que antes não eram percebidas ou não eram reconhecidas por causa da complexidade da amostra ou dos dados dela retirados.

Os alimentos têm sido objeto de diversos estudos devido a sua característica de essencialidade à vida [1,2,3]. A composição química dos produtos alimentícios é uma informação importante no que diz respeito ao controle de qualidade dos alimentos, *in natura* ou processados, consumidos em um país. Tal conhecimento é um elemento básico para ações de orientação nutricional baseadas em princípios de desenvolvimento local e diversificação da alimentação.

Os elementos químicos que participam do metabolismo dos seres humanos devem ser monitorados, mesmo que estejam presentes em baixas concentrações, devido à necessidade do controle da ingestão diária dos elementos essenciais ou não, e sua correlação com o seu estado nutricional. O estado nutricional reflete o grau nas quais as necessidades fisiológicas dos nutrientes estão sendo alcançadas, ou seja, a relação entre o consumo de alimentos e as necessidades nutricionais do indivíduo [4]. Os diferentes hábitos e as condições sócio culturais e ambientais característicos das diferentes regiões do planeta induzem a carências específicas de nutrientes, impactadas pelas diferentes dietas.

No Brasil, o projeto TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos), desenvolvido no intuito de gerar dados sobre a composição dos principais alimentos consumidos no país, vem contribuindo significativamente para a construção desse banco de dados que atualmente contempla 597 alimentos e estabelece valores de referência para uma série de nutrientes dos quais se destacam os macroelementos P, Ca, Na, Mg, K e os microelementos Mn, Fe, Cu e Zn [5].

As informações de uma tabela de composição de alimentos são pilares básicos para a educação nutricional, o controle da qualidade dos alimentos e a avaliação da ingestão de nutrientes por indivíduos ou populações. Através delas, autoridades de saúde pública podem estabelecer metas nutricionais e guias alimentares que levem a uma dieta mais saudável. Para evitar decisões ou

conclusões equivocadas, as tabelas precisam ser confiáveis, atualizadas e com maior número possível de itens, baseadas em análises conduzidas de acordo com plano de amostragem representativo e métodos validados, a fim de fornecer informações que verdadeiramente representem a composição dos alimentos do país. No momento, a tabela TACO parece ser o melhor veículo informativo brasileiro que atende aos critérios mencionados acima [5].

A deficiência de micronutrientes no organismo altera seriamente o crescimento e desenvolvimento normal do indivíduo. Por outro lado, o excesso de alguns elementos, a exemplo dos metais, em níveis de concentração tóxicos, também alteram seriamente as reações metabólicas e processos fisiológicos [6].

O aumento do consumo de vegetais tem sido relacionado à proteção contra doenças cardiovasculares e câncer devido à presença de alguns compostos bioativos conhecidos por seus efeitos benéficos. A prevenção é a melhor estratégia para o controle de doenças crônicas, dessa forma, o consumo constante de substâncias benéficas à saúde aliado a uma nutrição básica, é essencial para suprir os mecanismos de defesa do organismo. Uma vez que as plantas possuem diferentes tipos de fitoquímicos, os quais apresentam atividades protetoras específicas, para que se obtenha maior benefício à saúde, é necessário que se tenha uma dieta balanceada com grande variedade de fontes desses compostos como frutas, verduras e grãos [7] [8].

1.1.1 MACRO, MICRO E ELEMENTOS TÓXICOS EM ALIMENTOS

Os minerais são elementos inorgânicos amplamente distribuídos na natureza e que, no organismo, desempenham uma variedade expressiva de funções metabólicas que incluem ativação, regulação, transmissão e controle. Uma melhor quantificação destes elementos em alimentos e fluidos biológicos, assim como o conhecimento dos mecanismos através dos quais exercem suas funções no organismo, só foram possíveis através do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e precisas que têm sido propostas a partir da década de setenta [9]. Elementos como Ca, Mg, K e P são macro nutrientes essenciais para muitos organismos. Eles estão envolvidos em uma variedade de reações biológicas e suas

deficiências resultam em muitos problemas de saúde. Alguns elementos, como Cu, Mn e Zn, são micronutrientes essenciais ao homem, cuja necessidade diária não passa de poucos miligramas. Entretanto, micro nutrientes podem ser nocivos quando ingeridos em doses elevadas. Além disso, alguns elementos com o Ni e o Sn são prováveis micro nutrientes essenciais, embora seu papel positivo na nutrição humana seja foco de investigações, outros elementos não têm nenhuma função essencial provada em seres humanos e são prováveis fontes de efeitos fisiológicos adversos. Alguns elementos traço como Cd e Pb são bem conhecidos por seus efeitos tóxicos quando ingeridos ou inalados em excesso [10,11]. Outro fator que deve ser considerado é o fato de um metal poder ser considerado tóxico ou um nutriente, a depender de sua forma química ou especiação (como o Cr^{+6} e Cr^{+3}). Logo, a monitoração das deficiências, excessos ou desequilíbrios na provisão de elementos inorgânicos nos alimentos são importantes à saúde do indivíduo [10,12].

A quantidade de metais e metaloides ingeridos pelos seres humanos está diretamente relacionada a hábitos alimentares e a composição dos alimentos. A concentração dessas espécies em alimentos e talvez a sua biodisponibilidade esteja relacionados às características do solo como a quantidade de matéria orgânica, pH e condições mineralógicas. A poluição ambiental e a adição de produtos químicos como fertilizantes, fungicidas, inseticidas e herbicidas nas colheitas é um motivo de preocupação, uma vez que estes produtos podem conter vários metais e metalóides e suas aplicações podem aumentar a quantidade destes no solo e na água. Além disso, a forma física e química na qual eles são dispersos podem aumentar a biodisponibilidade dos metais para as plantas e assim aumentar a concentração destes nos vegetais [13]. As diferentes formas de ligação química dos elementos atuam em diferentes meios no curso das reações químicas nos alimentos e podem ter diferentes efeitos e disponibilidades biológicas [10]. O conhecimento da concentração de determinadas espécies químicas em alimentos pode fornecer informações importantes sobre o impacto da utilização de produtos químicos em colheitas e dos níveis de contaminação ambiental no setor agrícola.

As mudanças de hábitos alimentares nos levam, cada vez mais, a consumir uma quantidade significativa de produtos industrializados, apesar do fato de que muitos processos industriais podem alterar a qualidade nutricional devido à perda de nutrientes durante os processos de beneficiamento ou então sofrer enriquecimento

que afetam a qualidade ou o produto final. O arroz é um exemplo típico de alimento que sofre transformação durante o processo industrial, haja vista as diversas formas de apresentação deste produto. Os processos de beneficiamento e industrialização do arroz evoluíram bastante nos últimos anos e os atributos de qualidade deste produto devem ser avaliados. Neste sentido, a identificação e determinação de espécies individuais de minerais, elementos traço e contaminantes em alimentos, sobretudo o arroz, é de grande importância na química alimentar e na ciência da nutrição.

1.2 ARROZ

1.2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE ARROZ

O arroz (*Oryza sativa L.*) é originário da Ásia, sendo atualmente um dos cereais mais cultivados e consumidos em todo o mundo, sendo considerada uma cultura de grande importância econômica, movimentando de maneira efetiva sua cadeia produtiva [14].

A China lidera o ranking de maior produtor mundial de arroz, detendo mais de 30% do volume total produzido no planeta [15]. O Brasil, apesar da redução da produção nos últimos anos, devido às adversidades climáticas, é um grande produtor de arroz em nível mundial, apresentando posição de destaque como o 9º produtor, correspondendo a 2,5% da produção mundial e 50 % da produção da América Latina [16].

Em nosso país, a cultura de arroz ocupa atualmente o 3º lugar na produção de grãos, estando atrás apenas da soja e do milho [15]. Apesar de ser uma cultura comum em quase todo o país, a maior parte da produção ocorre em 5 estados – Rio Grande do Sul, onde predomina o arroz irrigado, concentra 64,3% da produção de 2011, Santa Catarina, 9,2% da produção, Mato Grosso, 3,7%, Maranhão, 5,6% e Tocantins com 3,8% da produção nacional [17].

De acordo com estatísticas de março e abril de 2010 da Companhia Nacional de Abastecimento, a safra brasileira 2009/2010 alcançou 11,5 milhões de toneladas de arroz em casca, sendo estimadas 13.208 toneladas para a safra 2011/2012. A

maior parcela da produção de arroz no Brasil é proveniente do ecossistema de várzeas, irrigado por inundação controlada, e o de terras altas (sequeiro), englobando o sem irrigação e com irrigação suplementar por aspersão, sendo a disponibilidade de água para a cultura de arroz sem irrigação totalmente dependente da precipitação pluvial [18].

Neste contexto, a orizicultura irrigada é responsável por 69% da produção nacional de arroz, sendo considerada um estabilizador da safra nacional, uma vez que não é tão dependente das condições climáticas como no caso dos cultivos em terras altas [18].

Em todo Brasil, o arroz é o principal produto da cesta básica do brasileiro, sendo consumido aproximadamente 75 kg/habitante/ano [19]. Tanto no Brasil, como na maioria dos países, o arroz é consumido principalmente na forma polida (70-80%), sendo que esta é a forma que consta nas estatísticas de produção, consumo e comércio globalizado [20].

1.2.2 ESTRUTURA DO GRÃO DE ARROZ

O grão de arroz é formado por uma camada externa protetora, a casca e a cariopse. A casca, composta de duas folhas modificadas, a pálea e a lema, corresponde a cerca de 20% do peso do grão, podendo variar dependendo da localização geográfica, estação do ano, temperatura e variedade cultivada. Minerais (sílica) e celulose são os maiores componentes da casca (Figura 1.1).

A cariopse é formada por diferentes camadas, sendo as mais externas o pericarpo, o tegumento e a camada de aleurona, que representam 5-8% da massa do arroz integral [21].

O pericarpo é a camada externa da cariopse, fornece proteção ao tegumento e proporciona a cor parda ao arroz integral, sendo rico em proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais. Logo abaixo, encontra-se o tegumento, uma película fina e delicada (0,5 μm), e a camada de aleurona que apresenta duas estruturas de armazenamento proeminentes, os corpos protéicos e os corpos lipídicos [21].

O embrião ou gérmen está localizado no lado ventral na base do grão, é rico em proteínas e lipídeos, e representa 2-3% do arroz integral. O endosperma forma a maior parte do grão (89-94% do arroz integral) e consiste de células ricas em grânulos de amido e com alguns corpos protéicos [21].

Na camada externa da semente de arroz está a maioria dos nutrientes de valor alimentício. Por meio da descascagem, separa-se a casca da cariopse, obtendo-se o arroz integral. Este pode ser polido para remoção do farelo (pericarpo, tegumento, camada de aleurona e gérmen), que representa 8,5 - 14,8% do arroz integral, obtendo-se o arroz branco polido. Os grãos também podem ser submetidos à parboilização, processo hidrotérmico através do qual se obtém o arroz parboilizado, o qual pode ser consumido na forma integral ou polido [22].

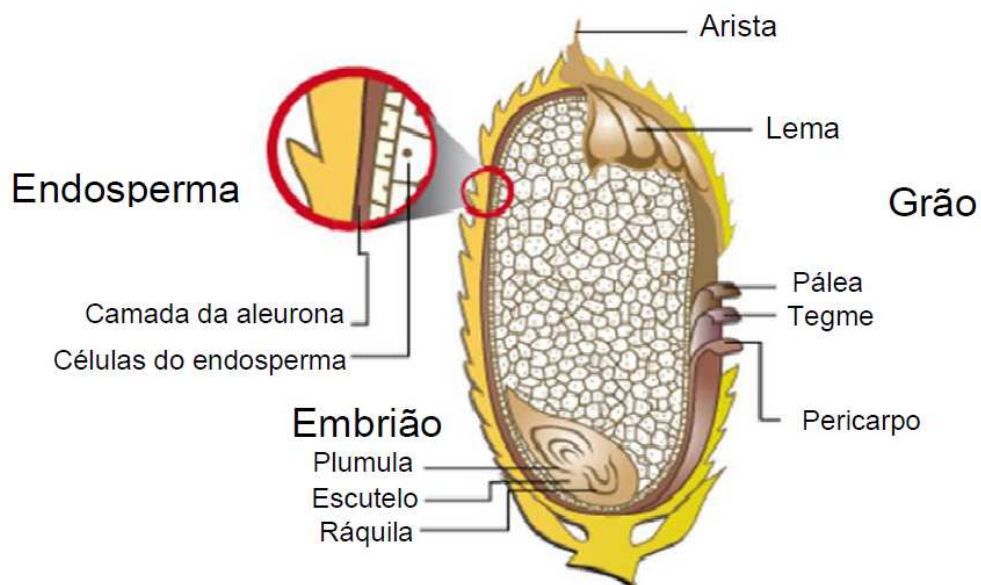


Figura 1.1: Representação esquemática da estrutura do grão de arroz.

Fonte: Encyclopedia Britannica, INC, 2009.

1.2.3 BENEFICIAMENTO DO GRÃO DE ARROZ

O grão de arroz, antes de estar na forma adequada para ser oferecido ao consumidor, passa por processos de beneficiamento e classificação [23]

No processo de beneficiamento do arroz, primeiramente o arroz com casca é submetido a uma pré-limpeza, seguida pelo processo de descascagem do grão, que separa a casca da cariopse, obtendo-se o arroz integral [22].

Em seguida, o grão descascado integral passa pelas etapas de brunição e polimento, quando são retirados o embrião (total ou parcialmente) e a maior parte da película que recobre o grão. A brunição é complementada pelo polimento, que consiste no acabamento do produto e remoção dos resíduos de farelo e de quirera, os principais subprodutos do beneficiamento [22].

O polimento tem o objetivo de melhorar a aparência e o gosto do arroz, porém apresenta fatores negativos em termos de nutrição, visto que neste processo, são perdidas partes das vitaminas dos minerais e da fibra dietética importantes na nutrição humana.

O arroz polido pode ser classificado em grupos, subgrupos, classes e tipos, conforme a Instrução Normativa Nº 6, de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Segundo a sua forma de apresentação, o arroz é classificado em dois grupos: (i) arroz em casca e (ii) arroz beneficiado.

De acordo com o processo de beneficiamento, o arroz em casca é classificado nos seguintes subgrupos: (i) arroz natural e (ii) arroz parboilizado. Da mesma forma, o arroz beneficiado apresenta os seguintes subgrupos: (i) arroz integral, (ii) arroz polido, (iii) arroz parboilizado integral e (iv) arroz parboilizado polido.

De acordo com as dimensões dos grãos, estes são classificados nas seguintes classes: (i) longo fino, (ii) longo, (iii) médio, (iv) curto e (v) misturado. Quanto ao tipo, o arroz em casca e o arroz beneficiado serão classificados em cinco tipos, de acordo com a sua qualidade, expressos por números arábicos e definidos pelos limites máximos de tolerância estabelecidos na Instrução Normativa Nº 6, podendo ainda ser enquadrado como fora de tipo e desclassificado.

No Brasil, o arroz é consumido e comercializado principalmente na forma polida, mas outras formas de beneficiamento com integral, parboilizado e polido e parboilizado integral são comercializados em menor escala [24].

O arroz polido apresenta maior aceitação pelo consumidor por possuir um sabor neutro que permite melhor combinação com outros alimentos [24]. No entanto, o polimento torna o arroz pobre em micronutrientes, visto que neste processo, são perdidas parte das vitaminas, minerais e fibras dietéticas.

O arroz integral é mais nutritivo em relação ao polido, porém é menos consumido devido, principalmente, ao seu sabor diferenciado e sua reduzida vida de prateleira [25].

A parboilização é um tratamento hidrotérmico onde o arroz ainda com casca é imerso em água potável para o encharcamento em temperatura acima de 58°C, seguido de gelatinização total ou parcial do amido em autoclave, e secagem. Posteriormente, o grão parboilizado é descascado podendo ser comercializado na forma “parboilizado integral” ou “parboilizado polido”, sendo que o consumo de arroz parboilizado polido apresenta maior aceitação [26].

Atualmente, o Brasil detém a tecnologia de parboilização mais avançada do mundo, o que proporcionou aumento significativo na qualidade tecnológica e mercadológica do arroz parboilizado, conquistando cada vez mais os diferentes nichos do mercado consumidor [24].

As principais vantagens tecnológicas e nutricionais do processo de parboilização sobre as outras formas de beneficiamento são aumento no rendimento industrial, redução da adesividade do arroz, esterelização do grão, aumento da vida de prateleira e migração de vitaminas hidrossolúveis e minerais do farelo para o centro do grão [27].

- **Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de mercúrio em amostras de arroz por MSFIA-CV-AFS**

2.1 INTRODUÇÃO

A utilização de diversas técnicas analíticas combinadas à geração de vapor frio é relativamente comum para a determinação de mercúrio em laboratórios de Química Analítica. Desta forma, muitos métodos analíticos têm sido propostos para quantificação de mercúrio empregando a espectrometria de absorção atômica (AAS) [28,29,30], a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) [31,32], a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) [33,34]. Este fato se deve a elevada eficiência de transporte do analito permitindo limites de detecção baixíssimos, separação do analito da matriz da amostra e solventes diminuindo possíveis interferentes e o confinamento do analito no caminho óptico, com maior tempo de residência deste, aumentando a precisão dos resultados [35].

Essas vantagens refletem a aplicação destes métodos na determinação de mercúrio em matrizes ambientais, alimentícias, geológicas, biológicas e industriais [36,37,38].

Dentre as técnicas citadas para determinação de mercúrio, a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) oferece grandes vantagens em termos de linearidade e níveis de detecção, pois atualmente, a sensibilidade tem melhorado muito em função da qualidade das lâmpadas empregadas como fonte de excitação. Suas limitações, como espalhamento, supressão da fluorescência (*quenching*) e emissão de fundo (*background*), dependem da matriz das amostras e do ambiente de atomização. Daí que a detecção por fluorescência atômica quando acoplada à técnica de vapor frio, dada à intrínseca separação do analito da matriz, oferece sensibilidade e especificidade [39], e limites de detecção comparáveis ao ICP-MS.

Neste trabalho desenvolveu-se um procedimento automático para a determinação de mercúrio total em amostras de arroz empregando injeção em fluxo com multiseringa (MSFIA) e detecção por CV-AFS (fluorescência atômica com vapor frio). Para isso, as variáveis pertinentes ao sistema foram otimizadas por método multivariado. Empregou-se o planejamento fatorial completo para avaliação preliminar das variáveis que afetam o sistema, seguido do planejamento Doehlert com o objetivo de se obter a metodologia de superfície de resposta para determinação das condições ótimas.

O método desenvolvido teve como parâmetros de validação: limite de detecção e quantificação, linearidade das curvas analíticas, precisão mediante determinação do desvio padrão relativo, avaliação da exatidão considerando análise de material de referência certificado e comparação entre resultados estabelecidos pelo método desenvolvido e outros existentes na literatura.

O método foi aplicado na determinação de mercúrio em doze amostras de arroz adquiridas em estabelecimentos comerciais na ilha de Palma de Mallorca-ES. As concentrações de mercúrio encontradas nas amostras variaram na faixa de 2,15 a 7,25 ng g⁻¹.

2.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2.1 O MERCÚRIO

O mercúrio encontra-se amplamente distribuído no meio ambiente como resultado de emissões naturais e, também da ação antropogênica. Pode ser encontrado nas águas, solos, ar e organismos vivos, normalmente em concentrações traço. Entretanto, mesmo em pequenas concentrações, o mercúrio é considerado tóxico para os mais diversos organismos [40].

A principal fonte de contaminação do homem por mercúrio, quando não exposto diretamente a ambientes propícios à contaminação, é através da alimentação. Uma característica do mercúrio é a sua tendência de acumulação através da cadeia alimentar [41]. Sob estes aspectos, alguns alimentos, apresentam elevada concentração de mercúrio, o que pode constituir um risco a saúde humana quando consumidos em excesso [42].

O mercúrio é um agente neurotóxico, que pode causar danos neurológicos irreversíveis e, em casos extremos, a morte. Além disso, deve ser considerado que diferentes espécies de mercúrio apresentam características distintas, como toxicidade, solubilidade, mobilidade biogeoquímica, tendência de acumulação, entre outras [14].

O mercúrio apresenta-se sob diversas espécies, sendo que estas podem ser classificadas em dois grupos: espécies inorgânicas e orgânicas. Dentre as espécies inorgânicas, a mais encontrada no ambiente é o íon mercúrio, Hg^{2+} , normalmente na forma de sal [43]. Já as espécies orgânicas possuem uma cadeia carbônica ligada ao mercúrio, sendo que a espécie mais encontrada é o metilmercúrio (MeHg), em que o mercúrio está ligado a um grupamento metil e um contra-íon [13].

Apesar de todas as formas de Hg poderem se acumular no organismo, as espécies orgânicas se acumulam em extensão muito maior. Isto ocorre porque elas apresentam maior lipossolubilidade e, desta forma, são transportadas mais facilmente através das membranas celulares, podendo então se acumular nos tecidos [44].

Assim, das espécies de mercúrio normalmente encontradas, o metilmercúrio (MeHg), é considerado mais tóxico que as demais espécies. No entanto, o mercúrio na forma Hg^{2+} é também bastante tóxico devido a sua grande afinidade com grupos sulfídricos das proteínas, enzimas, hemoglobina e albumina. Já a espécie elementar (Hg^0) apresenta baixa toxicidade em relação às demais espécies de mercúrio, porém quando absorvido pelo organismo através dos pulmões se oxida na corrente sanguínea a uma espécie mais tóxica (Hg^{2+}) e se distribui rapidamente pelo corpo através do sangue [45].

As manifestações clínicas associadas à intoxicação por mercúrio incluem náuseas, vômitos, cãibra, distúrbios visuais, inflamações gastrointestinais e danos ao sistema nervoso central, tais como; depressão, distúrbios de memória, dificuldade em articular palavras, tremor, fadiga, cefaléia e irritabilidade [18]. Além do exposto, o metil-mercúrio tem efeito feto-tóxico, com alterações irreversíveis para o feto, mesmo sem o aparecimento de sintomas na mãe [46].

2.2.2 A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO EM ARROZ

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. A produção anual de arroz no mundo é de aproximadamente 606 milhões de toneladas [47].

O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, e possui baixo teor de lipídios. A concentração de minerais difere nas frações do grão. O conteúdo mineral é grandemente influenciado pelas condições de cultivo, incluindo fertilização e condições do solo, e pelo processamento.

O mercúrio é um elemento altamente perigoso e potencialmente tóxico devido a seu comportamento acumulativo e persistente, sendo os alimentos uma das principais fontes de contaminação de mercúrio para o ser humano. Em virtude disso o conjunto FAO/WHO, estabelece a ingestão tolerável semanal de mercúrio total de

5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal ou 43 μg por dia para um indivíduo de 60 kg. Quanto a legislação Brasileira, a mesma por meio do Decreto nº 55871, de março de 1965 estabelece o valor de 0,010 mg kg^{-1} como limite máximo de tolerância de mercúrio em qualquer outro alimento que não seja peixe, crustáceo e molusco.

Diante do exposto, verifica-se que nos últimos anos tem aumentado o interesse em desenvolver métodos sensíveis para determinar mercúrio em níveis muito baixos em amostras de alimento, especialmente no arroz que é um dos grãos cereais mais consumidos mundialmente.

Da Silva *et al.*, [48] recentemente propuseram um método para a determinação de mercúrio em arroz utilizando CV AFS. O método proposto se baseia na digestão da amostra em forno microondas utilizando ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, seguido de diluição contendo KBr/KBrO₃ e hidroxilamina. Utilizaram como agente redutor o SnCl₂ em meio ácido (HCl) e obtiveram como limite de detecção o valor de 0,90 ng g^{-1} . A faixa de concentração de mercúrio encontrada em 24 amostras analisadas foi entre 1,3 a 7,8 ng g^{-1} .

Li *et al.*, [49], desenvolveram um método analítico empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP MS) para especiar metilmercúrio em arroz cultivado em áreas próximas a mineração de mercúrio. O método foi baseado em hidrólise enzimática e concluíram que em arroz cru o MeHg apresenta-se quase exclusivamente como CH₃Hg-cisteína e que o cozimento converte a maioria do CH₃Hg-cisteína a outras formas de MeHg, sendo que o teor de mercúrio total em amostras de arroz com ou sem cozimento não eram significativamente diferentes.

Qiu *et al.*, [50], avaliaram o teor de metilmercúrio em arroz cultivados em áreas abandonadas de mineração de mercúrio na China. Para determinação do teor de mercúrio total empregaram digestão a 95 °C em banho de água utilizando a mistura ácida HNO₃/H₂SO₄. Para análise de MeHg as amostras foram digeridas usando KOH-metanol com posterior emprego da técnica de extração com solvente para a análise de MeHg. O mercúrio total foi determinado utilizando CV AFS e o metilmercúrio utilizando cromatografia gasosa acoplada ao CV AFS. As amostras analisadas apresentaram concentração de mercúrio total e metilmercúrio equivalentes a 17,5 - 608 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 7,31 - 62,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente.

Silva *et al.*, [51] desenvolveram um método analítico utilizando amostragem em suspensão e técnicas de otimização multivariada para a determinação de mercúrio em amostras de arroz empregando espectrometria de absorção atômica de alta resolução e fonte contínua com geração de vapor frio (CV HR-CS AAS). A concentração de mercúrio nas amostras analisadas variou de 4,10 a 13,7 ng g⁻¹, apresentando uma média de 8,36 ng g⁻¹ e os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,95 e 3,18 ng g⁻¹, respectivamente.

2.2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE EM FLUXO

A crescente necessidade de automação de procedimentos analíticos se deve ao aumento significativo do número de amostras laboratoriais a serem analisadas, por exemplo, nas áreas clínicas e ambientais, e à demanda por técnicas rápidas e confiáveis freqüentemente requeridas para controle de processos industriais [52].

Sem dúvidas, as técnicas de análises em fluxo têm sido os métodos automáticos de análise que maior interesse tem despertado dentro da química analítica. Desde o surgimento dos primeiros sistemas em fluxo segmentado (SFA), as técnicas em fluxo têm evoluído, surgindo outras técnicas tais como a análise por injeção em fluxo (FIA), análise por injeção seqüencial (SIA), análise em fluxo multicomutado (MCFIA), e mais recentemente as análises por injeção multiseringa (MSFIA) e sistemas multibombas (MPS) [53].

A análise por injeção em fluxo que inclui multiseringa no módulo de análises (MSFIA, do inglês "*Multisyringe Flow Injection Analysis*") foi descrita em 1999 [54], e é caracterizada pela utilização de um conjunto de seringas empregadas como dispositivo de propulsão. As análises por injeção multiseringa (MSFIA) combinam a operação de multi canal e o alto rendimento do FIA com a robustez e a versatilidade do SIA [55]. Os sistemas MSFIA apresentam como componente elementar a multiseringa, que permite o movimento simultâneo de quatro seringas de diferentes capacidades. Estas são ligadas em bloco a um único motor de uma bureta automática convencional, que é controlada por um computador [56]. Deste modo, o movimento do motor propulsiona os êmbolos das seringas, operando em modo multicanal, de forma semelhante às bombas peristálticas dos sistemas FIA. A

utilização de seringas com diferentes volumes associados ao número de ciclos do motor da bureta permite que estas apresentem diferentes vazões, uma vez que as mesmas são acionadas simultaneamente com a mesma velocidade. Os sistemas MSFIA combinam um modo de operação multicanal, como nos sistemas FIA, com a possibilidade de seleção de volumes exatos de amostra e de reagentes necessários para a análise, como nos sistemas SIA, além da possibilidade de multicomutação.

A válvula solenóide acoplada à extremidade de cada seringa possibilita a redução no consumo de reagentes, uma vez que estes são introduzidos no sistema apenas quando necessários. De fato, a presença da válvula permite o retorno das soluções aos seus devidos reservatórios viabilizando a reciclagem dos mesmos].

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um procedimento analítico automático para determinação de mercúrio em amostras de arroz utilizando sistema MSFIA-CV-AFS.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer condições ótimas de preparo de amostra para a determinação de mercúrio em arroz, de forma simples e eficaz;
- Empregar a técnica CV AFS para determinação de mercúrio em arroz;
- Empregar sistemas MSFIA acoplado ao sistema de detecção;
- Empregar a técnica de otimização multivariada para estabelecer as variáveis pertinentes ao método proposto (planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta);
- Empregar procedimentos validados para avaliação da exatidão do método proposto;
- Aplicar o método proposto em amostras de arroz adquiridas em Palma de Mallorca, Espanha.

2.4 PARTE EXPERIMENTAL

2.4.1 SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO

O sistema para determinação de mercúrio total em amostras de arroz baseou-se na análise por injeção em fluxo multiseringa (MSFIA).

O sistema MSFIA utilizou como impulsor de soluções um módulo de multiseringas (Multiburette 4S, Crison, Barcelona, Espanha), conectadas em um bloco, que se movem simultaneamente com velocidades programáveis (Figura 2.1).

No sistema proposto apenas duas seringas (Hamilton, Suíça) foram utilizadas (5,0 e 2,5 mL), as quais estavam conectadas no bloco mediante uma barra de pistão.



Figura 2.1: Módulo de multiseringas utilizado para o sistema MSFIA.

Cada seringa tem em sua parte superior uma válvula solenóide de três vias (N-Research, Caldwell, NJ, USA), as quais permitem a multicomutação. As válvulas solenóides possuem duas posições: 'on' e 'off', as quais permitem a conexão de um canal comum a dois diferentes canais de entrada e saída, mediante a ativação e desativação da válvula solenóide. As posições 'on' e 'off' são independentes do

deslocamento do pistão, resultando duas direções opcionais de fluxo para o movimento ascendente do pistão e outras duas para o movimento descendente (Figura 2.2). Usualmente, a posição 'on' se conecta ao sistema, enquanto a posição 'off' é atribuída à água como solução carreadora e aos reativos.

A implementação destas válvulas de comutação na parte superior de cada seringa permite a injeção precisa de volumes bem definidos de amostra e reagentes de acordo com uma programação estabelecida para efetuar as medições analíticas. Além disso, permitem a devolução dos reagentes e a condução dos mesmos a seus respectivos reservatórios, nas etapas que são requeridas.

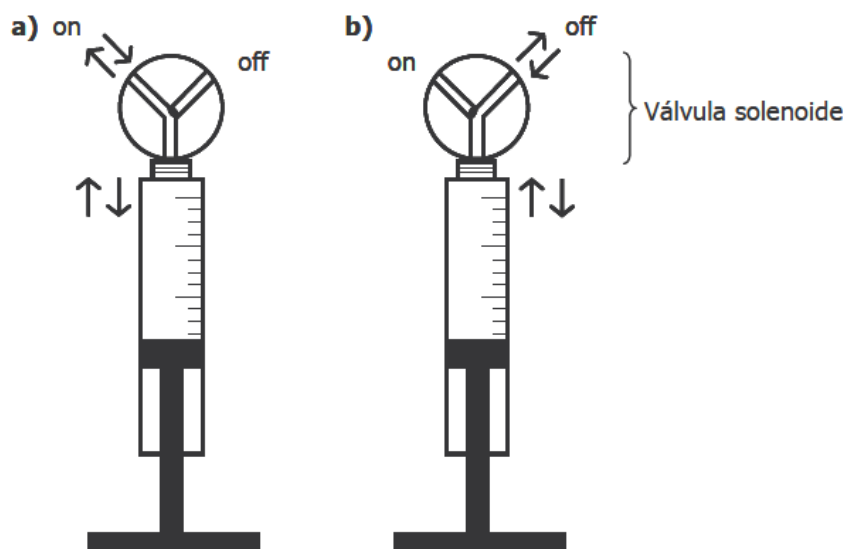


Figura 2.2: Representação das válvulas solenóides acopladas na parte superior de cada seringa. (a) válvula solenóide ativada: posição 'on'; (b) válvula solenóide desativada: posição 'off'.

Quando a válvula solenóide é usada, um sistema de proteção (Sciware, Palma de Mallorca, Espanha) faz-se necessário para proteger o sistema minimizando a geração de calor e prolongar a vida útil da válvula.

Os tubos para condução da amostra e dos reagentes são constituídos de politetrafluoretileno (PTFE) contendo 1,5 mm e 0,80 mm de diâmetro interno. A tubulação de 1,5 mm de diâmetro foi utilizada para aspirar a amostra e reagentes para a bobina de reação onde ocorre a formação do *spray*, conduzido em seguida para o separador gás-líquido. Ao mesmo tempo um tubo misturador de amostra-

reagente de 0,80 mm de diâmetro interno é utilizado para permitir a mistura gás-líquido e fazer a conexão com uma bobina de pulverização.

Um separador gás-líquido modelo Perkin Elmer B0507959 foi utilizado com uma membrana de PTFE permutável (25 mm de diâmetro, 1 µm de espessura, Schleicher e Shuel, Dassel, Alemanha). A mesma foi colocada na tampa do separador gás-líquido para evitar que o líquido fosse transportado ao detector. A remoção do excesso de líquido no separador gás-líquido foi controlado com uma microbomba solenóide (Biochem válvula Inc., Boonton, NJ, EUA).

A microbomba solenóide foi ativada através de um módulo controlado por computador (Sciware, Palma de Mallorca), constituído por uma placa com interface digital, oito canais digitais de saída e uma fonte de alimentação interna de 12 V necessária para ativar a micro-bomba solenóide.

Um sistema para eliminação de umidade mediante o uso de uma membrana higroscópica Perma Pure (Toms River, NJ, USA). Nesta a água move-se através da parede da membrana e evapora para o gás circundante.

2.4.2 SISTEMA DE DETECÇÃO

Um espectrômetro de fluorescência atômica para mercúrio (P.S. Analytical, modelo 10.023, Orpington, UK) foi utilizado como detector (Figura 2.3). O mesmo apresenta quatro ganhos internos e um externo “fine gain” que permite trabalhar em uma ampla faixa de concentração.

A fonte de luz é uma lâmpada de mercúrio de alta intensidade específica (Nuffield Road, Cambridge). O vapor de mercúrio quando passado alimenta o conjunto óptico, revestido de um fluxo adicional de argônio. Uma interface está posicionada diretamente sob o caminho da luz de forma que o vapor de mercúrio fornece a resposta máxima.



Figura 2.3: Espectrômetro de fluorescência atômica de mercúrio.

2.4.2 SOFTWARE

O sistema de controle instrumental, a aquisição e processamento de dados foi realizado utilizando o software Autoanalysis 5.0 (Sciware, Palma de Mallorca, Espanha) desenvolvido pelo Grupo de pesquisa em Química Analítica, Automatização e meio ambiente [15].

A característica distintiva deste programa é a viabilidade de usar uma aplicação simples e versátil, para qualquer instrumentação e sistema de detecção utilizados. Além disso, permite simultaneamente a aplicação do método em fluxo, o tratamento de dados pelo mesmo programa e a edição de documentos com outros programas comerciais.

O programa inclui um protocolo básico, que permite a configuração dos equipamentos que compõem o sistema em fluxo. Para começar seleciona-se de uma lista disponível, os canais de comunicação necessários para o detector e demais instrumentos. Em seguida, se carregam as pastas individuais e específicas de casa instrumento, tais como o controle do módulo multiseringa e o espectrofotômetro (Figura 2.4).

A edição de um método analítico com o programa AutoAnalysis consiste em criar uma sequência de instruções, onde cada instrução é executada por um dos

instrumentos conectados ou é um comando definido pelo sistema para controlar o tempo, condicionar a repetição de procedimentos. Um procedimento é um conjunto de instruções agrupadas com o mesmo nome, que se pode repetir dentro do mesmo método ou pode ser utilizado por métodos diferente, com a vantagem de defini-lo só uma vez.

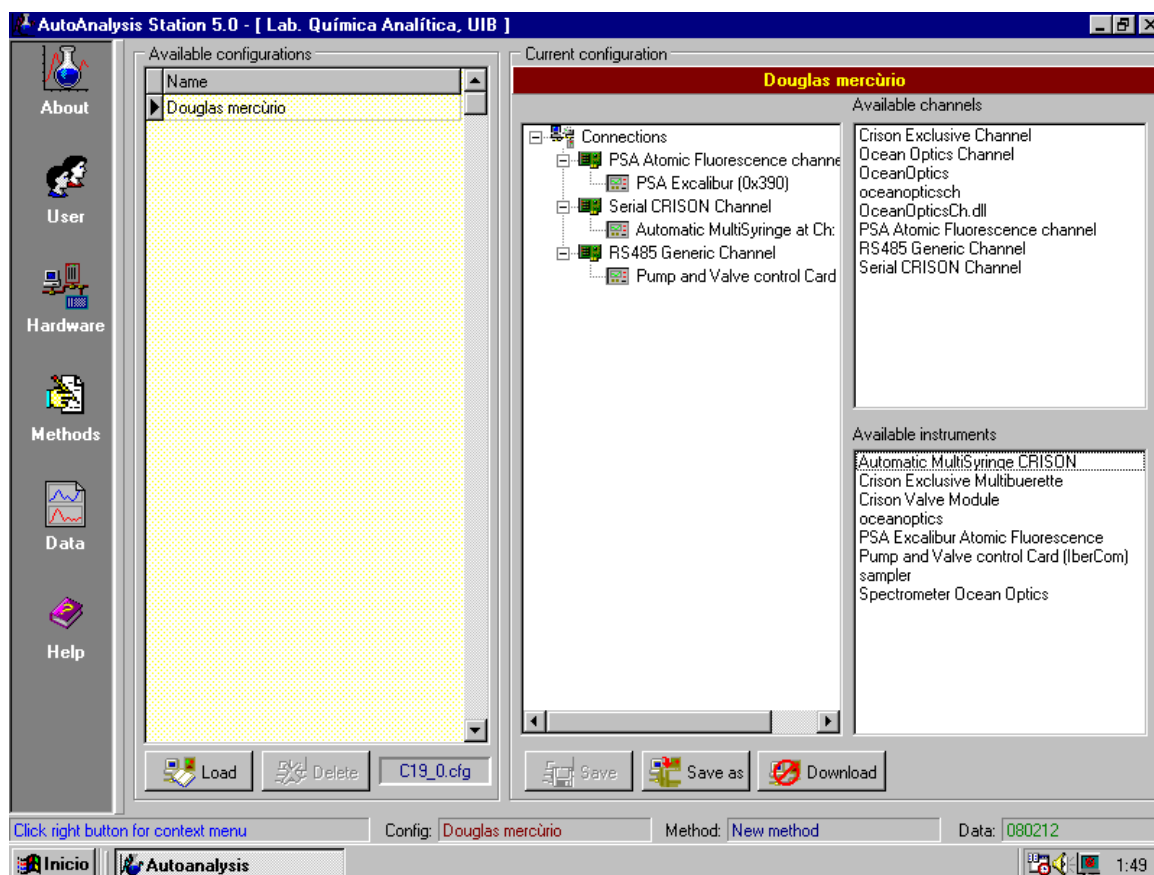


Figura 2.4: Painel de controle de conexão de conexões do programa AutoAnalysis.

A execução das instruções dos instrumentos pode se dá de duas maneiras, de uma forma exclusiva durante a qual não se realiza nenhuma outra instrução até o final do curso, e de forma não exclusiva segundo a qual o método continua com a execução dos passos sucessivos sem finalizar a etapa que está em curso (Figura 2.5).

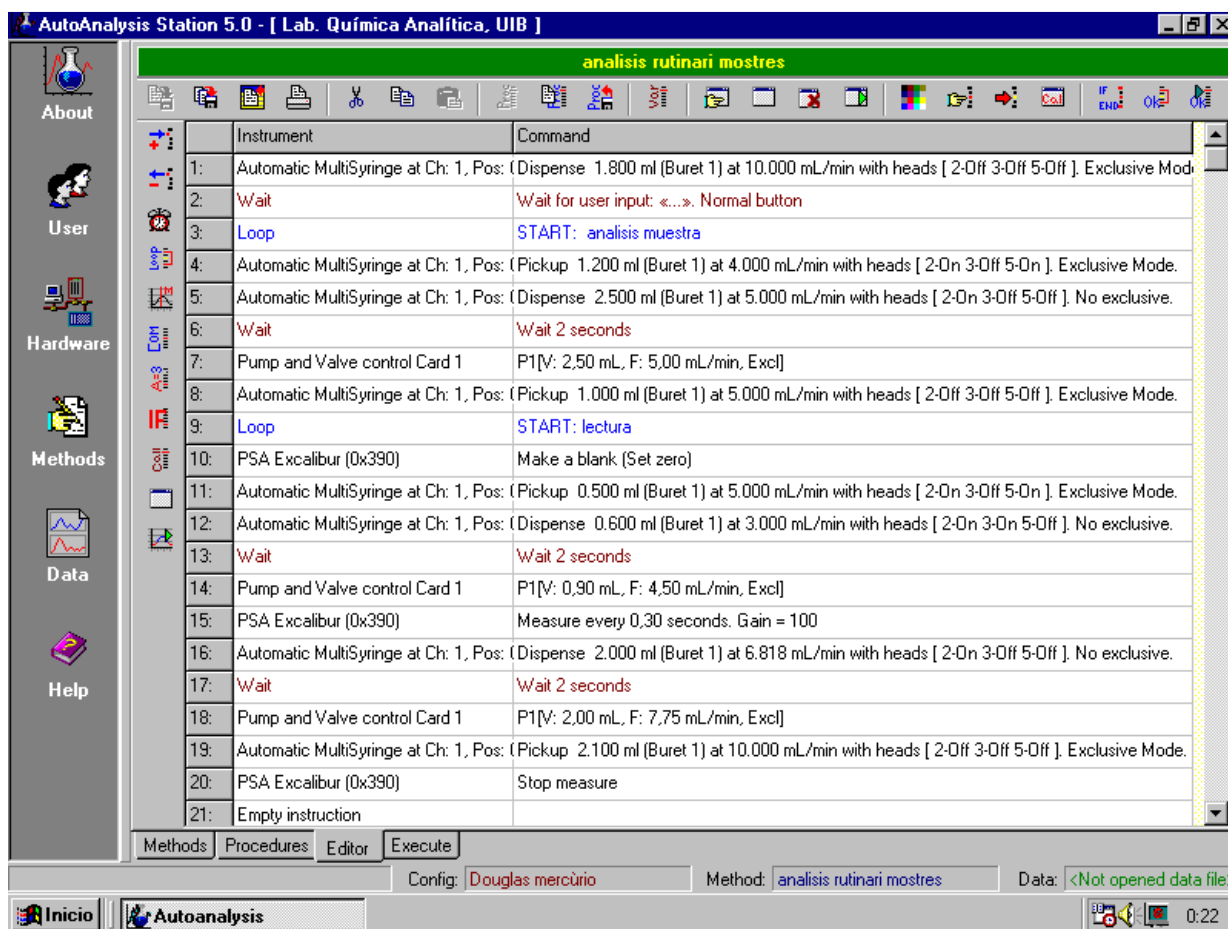


Figura 2.5: Painel de edição dos métodos analíticos do Programa AutoAnalysis.

Uma vez definido o método, se processa a execução do mesmo. Mediante uma barra de ferramentas pode-se controlar os parâmetros de trabalho. O programa AutoAnalysis registra o sinal analítico e fornece um valor numérico do parâmetro de interesse baseado em que o sinal (altura do pico, área do pico) que foi selecionado pelo usuário. Além disso, permite o processamento dos dados adquiridos e aqueles registrados em experimentos anteriores. Também se pode armazenar os espectros obtidos durante o experimento e recuperá-los em outro momento.

2.4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

Para assegurar elevada sensibilidade nas análises, todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, produzida por um sistema Milli-Q (resistividade > 18 MΩ cm⁻¹, Millipore, Bedford, EUA).

Todos os reagentes químicos utilizados foram de alto grau analítico. Ácidos nítrico e clorídrico utilizados possuíam baixo conteúdo de metais (máximo de 0,005 mg L⁻¹ e 0,001 mg L⁻¹ de Hg respectivamente), obtidos pela *Merck* (Darmstadt, Alemanha).

Solução estoque de Hg(II) 1000 mg L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução do sal HgCl₂ (Scharlau, Barcelona, Espanha). Para isso dissolveu-se 0,1354 g de HgCl₂ em 20 mL de água ultra pura. Adicionou-se 5 mL de ácido nítrico concentrado e diluiu-se com água ultra pura até completar o volume de 100 mL.

Uma solução estoque intermediária 10 mg L⁻¹ de Hg(II) em meio a HCl 37% (v/v) era preparada semanalmente. Para isto efetuava-se a diluição de 5 mL da solução estoque anterior de 1000 mg L⁻¹ de Hg em aproximadamente 100 mL de água. Em seguida adicionava-se 75 mL de HCl e completava-se o volume de 500 mL com água ultrapura.

Solução de cloreto estanhoso 3% (m/v) foi preparada diariamente em HCl 5% (v/v) dissolvendo-se 1,5 g SnCl₂.2H₂O obtida pela *Merck* (máximo de Hg 0,000001%) em um balão de 50 mL contendo 2,5 mL de HCl. Para eliminar os possíveis traços de mercúrio, borbulhou-se a solução com argônio durante 15 minutos a uma vazão de 2 L min⁻¹.

2.4.4 AMOSTRAS

O estudo visando a determinação de mercúrio foi realizado em amostras de arroz adquiridas em estabelecimentos comerciais localizados em Palma de Mallorca - Es, produzidos em diferentes regiões do país, entre os meses de janeiro a abril de 2012.

Após aquisição as amostras de arroz eram acondicionadas em frascos de polipropileno, previamente descontaminados com solução de ácido nítrico 10% (v/v), por 24 horas, e lavados com água ultra pura para eliminação de metais interferentes.

2.4.5.1 PREPARO DA AMOSTRA EMPREGANDO DECOMPOSIÇÃO EM FORNO DE MICRO-ONDAS

O procedimento de digestão foi otimizado pesando-se com precisão de 0,001 g, aproximadamente 0,5 g da amostra de arroz parcialmente macerado em grãos menores. Empregou-se uma mistura oxidante de 2,0 mL de HNO₃ concentrado, 1,0 mL de H₂O₂ e 5,0 mL de água ultra pura. O forno de micro-ondas foi programado para aquecer a amostra em sete etapas a uma pressão de 45 bar, como é mostrado na Tabela 2.1. Na etapa 7, o sistema foi arrefecido durante 40 minutos, utilizando ventilação forçada.

Após a digestão, as amostras e os brancos foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL e tiveram o volume completado com HNO₃ 8% (v/v). A fim de eliminar possíveis interferências causadas por óxido de nitrogênio adicionou-se às amostras e aos brancos 100 µL de K₂Cr₂O₇ 2000 mg L⁻¹ [157].

Todo o procedimento foi realizado em triplica para as amostras de arroz digeridas e brancos analisados.

Tabela 2.1: Programa de aquecimento para a digestão da amostra em forno microondas.

Etapa	Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
1	5	800	80
2	2	800	80
3	4	900	120
4	2	900	120
5	10	1000	180
6	10	1000	180
Ventilação	40	-	-

2.4.6 ESTRATÉGIA DE OTIMIZAÇÃO

As variáveis concentração do HNO_3 , concentração do SnCl_2 e vazão da amostra foram otimizadas simultaneamente utilizando o planejamento fatorial completo com o objetivo de se ter uma ideia das variáveis que mais afetam o sistema e dos possíveis efeitos de interação entre as mesmas.

O planejamento fatorial foi efetuado com réplica dos pontos centrais para realização do teste de curvatura, e assim, verificar se dentro do domínio experimental seria possível encontrar pontos críticos com a aplicação de uma superfície de resposta.

A partir dos resultados obtidos com planejamento fatorial completo, foi possível identificar uma curvatura significativa, indicando que uma região de máximo poderia ser encontrada na região do ponto central. Para uma melhor investigação e obtenção desses valores, fixou-se a variável vazão da amostra, já que essa apresentou um menor efeito dentro do sistema e aplicou-se um planejamento matriz de Doelhart para as duas variáveis restantes: concentração de HNO_3 e concentração de SnCl_2 .

Como resposta analítica, para ambos os planejamentos utilizou-se o parâmetro intensidade de fluorescência (altura de pico) e os dados experimentais foram processados no programa STATISTICA 7.0 com nível de confiança a 95 %.

2.4.7 CALIBRAÇÃO

A curva analítica em meio aquoso consistiu em transferir alíquotas de 2,50; 12,5; 25,0; 37,5 e 50,0 μL da solução intermediária de Hg 1,0 mg L^{-1} para balões volumétricos de 25 mL com o objetivo de se obter concentrações entre 0,10 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida os balões foram avolumados utilizando solução de HNO_3 8,0 % (v/v). Foi construída uma curva analítica por adição padrão nas amostras de arroz, realizando-se o mesmo procedimento para a calibração aquosa.

2.4.8 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

O Sistema MSFIA-CV-AFS utilizado para determinação de mercúrio em amostras de arroz está representado na Figura 2.6.

Uma válvula solenóide de três vias (SV) foi ligada a uma bobina (SC) conectada a uma seringa (S1) para aspirar a amostra. A seringa S1 era também responsável por dispensar a amostra com água ultra pura, enquanto a seringa S2 foi usada para dispensar a solução redutora (SnCl_2).

A fim de atingir uma boa eficiência de reação, o fluxo era parado na bobina de reação (RC) durante 30 segundos. Este procedimento de parada do fluxo oferece duas vantagens ao sistema: a dispersão da amostra cessa enquanto a reação química continua e o consumo de soluções e geração de resíduos são reduzidos.

Em seguida, a mistura era transportada para um encaixe conector de três vias, onde entrava em contato com uma corrente contínua de argônio. O *spray* gerado permitia uma ótima separação do mercúrio elementar a partir da fase líquida.

A mistura gás-líquido era então separada através de um separador gás-líquido. A fase gasosa contendo mercúrio elementar proveniente do separador gás-líquido atravessava a membrana de PTFE e era direcionada ao detector de mercúrio. A umidade do argônio, utilizado como gás transportador, foi removido por uma membrana higroscópica (GD) impedindo a entrada de vapor de água para dentro da célula de detecção e possíveis interferências.

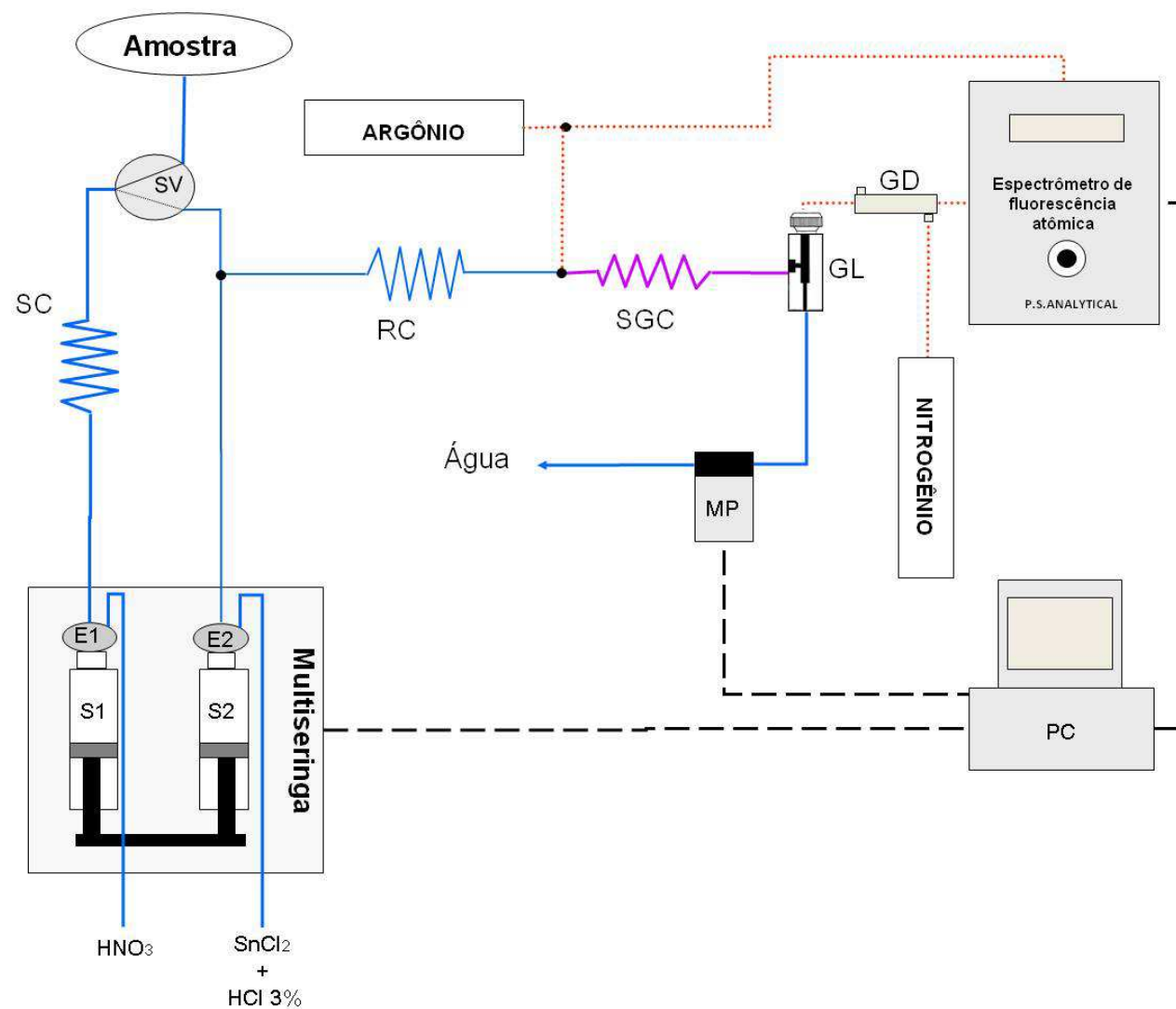


Figura 2.6: Sistema MSFIA-CV-AFS para determinação de mercúrio. SC: Bobina da amostra; GL: Separador gás-líquido; RC: Bobina de reação; MP: Micro bomba; SV: Válvula solenóide; SGC: Bobina de geração do *spray*; PC: Computador; GD: membrana higroscópica *Perma Pure*.

A Figura 2.7 apresenta o esquema da membrana higroscópica semipermeável, que consta de dois tubos concêntricos. O tubo exterior é feito de politetrafluoretileno (PTFE) e o interior é uma membrana de nafion. As espécies voláteis do mercúrio, o vapor d'água, assim como o gás transportador (argônio) fluem ao longo do tubo de nafion, e a umidade atravessa a membrana; um gás de secagem (nitrogênio) flui a contracorrente ao longo do tubo de PTFE, eliminando a umidade da superfície exterior da membrana.

A fase líquida era removida por meio de uma micro bomba (MP), ilustrada na Figura 6, controlada pelo software, a fim de manter um volume constante de líquido dentro do separador gás-líquido.

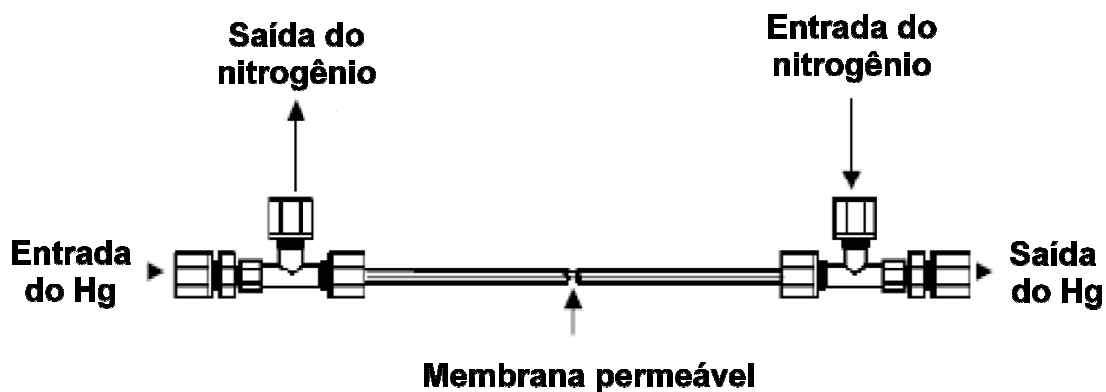


Figura 2.7: Esquema da membrana permeável.

Os parâmetros analíticos característicos do sistema MSFIA-CV-AFS estão mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Parâmetros característicos do sistema MSFIA-CV-AFS.

Vazão de fluxo	
Bomba S1: Amostra e Branco	3,0 mL min ⁻¹
Bomba S2: Agente redutor (SnCl ₂)	1,5 mL min ⁻¹
Volume	
Amostra	0,500 mL por injeção
Agente redutor	0,300 mL por injeção
Detector de mercúrio	
Fonte	Lâmpada de mercúrio
Linha analítica	254,0 nm
Sensibilidade	1000
Corrente do gás argônio	110 mL min ⁻¹
Corrente do gás nitrogênio	300 mL min ⁻¹

2.4.9 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação analítica garante a credibilidade da metodologia a ser aplicada rotineiramente no laboratório, sendo definido como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer.

Efetuuou-se a validação do método proposto, com a verificação dos limites de detecção, quantificação, faixa de trabalho, linearidade analítica, exatidão, precisão e recuperação.

Para verificação da exatidão do mercúrio total determinado por MSFIA-CV-AFS foi analisado o material de referência certificado de farinha de arroz NIST 1568a e foi também calculada a porcentagem de recuperação com adição de padrão com concentração conhecida.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO POR MSFIA-CV-AFS

Na etapa de otimização foram realizados estudos com o objetivo de se obter as melhores condições para o método proposto. Assim, estudou-se os seguintes fatores para a otimização do sistema MSFIA-CV-AFS: concentração do cloreto estanhoso, concentração do ácido nítrico e vazão da amostra. Para isso, foi realizado primeiramente um planejamento fatorial completo (2^3), a fim de avaliar a significância e o efeito dos fatores, bem como a interação entre eles.

Posteriormente empregou-se um planejamento Doelhart com objetivo de obter as condições críticas de cada fator para a determinação de mercúrio por MSFIA-CV-AFS.

2.5.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

O planejamento fatorial 2^3 foi realizado com a intenção de investigar de forma preliminar a influência das variáveis (concentração de HNO_3 , concentração de SnCl_2 e vazão da amostra) e suas interações no processo de determinação de mercúrio em arroz. Os níveis selecionados para os fatores estão definidos na Tabela 2.3 e a matriz requerida para os experimentos do planejamento fatorial completo junto aos resultados obtidos, expressos como intensidade de fluorescência, está descrita na Tabela 2.4.

Tabela 2.3: Níveis das variáveis no planejamento fatorial 2³.

Variável	Valor mínimo (-)	Valor máximo (+)	Ponto Central
Concentração SnCl ₂ (%m/v)	1,00	5,00	3,00
Concentração HNO ₃ (%v/v)	6,00	10,0	8,00
Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	1,00	5,00	3,00

Tabela 2.4: Matriz e resultados do planejamento fatorial de dois níveis para determinação de mercúrio em amostras de arroz com valores reais e codificados.

Experimento	[HNO ₃]	[SnCl ₂]	Vazão	Int. fluorescência
01	-1 (6,00)	-1 (1,00)	-1 (1,00)	23,60
02	+1 (10,0)	-1 (1,00)	-1 (1,00)	24,15
03	-1 (6,00)	+1 (5,00)	-1 (1,00)	29,09
04	+1 (10,0)	+1 (5,00)	-1 (1,00)	41,62
05	-1 (6,00)	-1 (1,00)	+1 (5,00)	22,81
06	+1 (10,0)	-1 (1,00)	+1 (5,00)	36,11
07	-1 (6,0)	+1 (5,00)	+1 (5,00)	35,02
08	+ (10,0)	+1 (5,00)	+1 (5,00)	36,53
Ponto Central				
09	0 (8,00)	0 (3,00)	0 (3,00)	35,90
10	0 (8,00)	0 (3,00)	0 (3,00)	35,70
11	0 (8,00)	0 (3,00)	0 (3,00)	35,75

A significância dos efeitos relacionados às variáveis estudadas foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) e os efeitos foram verificados utilizando-se os valores p [57].

Os resultados da ANOVA apresentados na Tabela 2.5 podem ser apresentados como gráfico de Pareto, mostrado na Figura 2.8.

Os experimentos realizados no planejamento fatorial revelaram que todas as variáveis apresentam efeito significativo ($p < 0,05$) para o domínio experimental estudado. Em meio às interações de segunda ordem, destacou-se o efeito entre as variáveis concentração do SnCl_2 e vazão da amostra.

O efeito estimado da variável indica o quanto esta variável exerce influencia sobre a resposta analítica. Os valores positivos apresentados Diagrama de Pareto indicam que quando se passa do nível mínimo ao nível máximo da variável, o valor da resposta analítica aumenta. Quanto maior o valor mais significativo é o fator. Quando se tem um efeito negativo esse indica que ao passar de um nível mínimo para um nível máximo da variável o valor da resposta diminui.

Tabela 2.5: Tabela da ANOVA dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 4.

	SQ	GI	MQ	F	Valor p
[HNO ₃]	97,5993	1	97,5993	2443,360	0,000409
[SnCl ₂]	157,8482	1	157,8482	3951,668	0,000253
Vazão	18,2224	1	18,2224	456,190	0,002185
[HNO ₃]x[SnCl ₂]	0,0070	1	0,0070	0,175	0,716103
[HNO ₃]xVazão	0,3453	1	0,3453	8,645	0,098824
[SnCl ₂]xVazão	13,2450	1	13,2450	331,584	0,003002
Falta de ajuste	116,8980	2	58,4490	1463,247	0,000683
Erro puro	0,0799	2	0,0399		
SQ total	404,2452	10			

SQ: soma quadrática; gl: graus de liberdade; MQ: média quadrática; Valor p: nível de probabilidade.

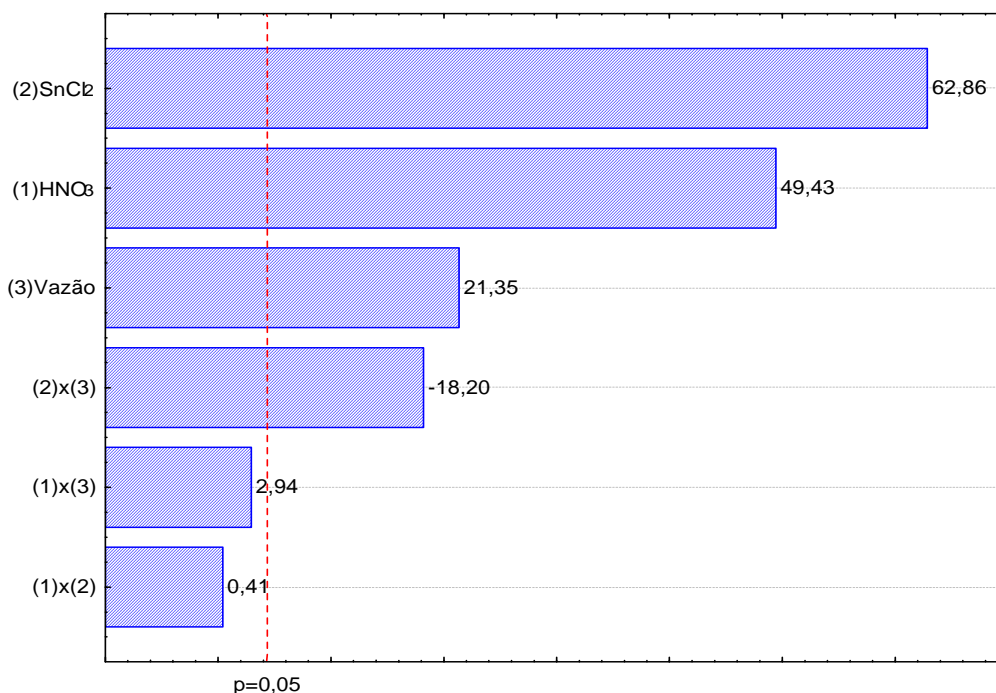


Figura 2.8: Diagrama de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas no sistema MSFIA-CV-AFS.

O modelo matemático que relaciona os fatores envolvidos na otimização (concentração de HNO₃, concentração de SnCl₂ e vazão da amostra) com a intensidade de fluorescência, está representado abaixo pela equação 2.1, no qual os termos significativos estão destacados em negrito.

(Equação 2.1):

$$I.F = 32,3616 + 3,4928(\mathbf{HNO_3}) + 4,4420(\mathbf{SnCl_2}) + 1,5092(\mathbf{Vazão}) + 0,0296(\mathbf{HNO_3})(\mathbf{SnCl_2}) + 0,2078(\mathbf{HNO_3})(\mathbf{Vazão}) - 1,2867(\mathbf{SnCl_2})(\mathbf{Vazão})$$

Dentre as variáveis estudadas a concentração do SnCl₂ mostrou ser a mais significativa. De fato, a concentração do SnCl₂ é muito importante, já que o mercúrio é reduzido a vapor por adição deste agente redutor.

A concentração do HNO₃ revelou-se também como uma variável significativa e, quanto maior a sua concentração melhor a resposta do sinal analítico. Este fato,

explica a necessidade de se fazer uso de maiores concentrações de SnCl_2 . Contudo, se a concentração do HNO_3 for muito alta ocorre um borbulhamento desordenado da solução dentro do separador gás-líquido impedindo assim a fase gasosa contendo mercúrio elementar atravessar a membrana de PTFE e ser direcionado ao detector.

O valor de p é o nível de significância da variável independente sobre a resposta estudada. Geralmente o intervalo de confiança escolhido é de 95%, com esse intervalo pode-se afirmar que, para valores de $p \leq 0,05$, a variável é considerada estatisticamente significativa.

Além disso, os três fatores estudados tiveram os seus efeitos calculados sobre a geração de vapor. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6: Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.

Efeito	Valor
Concentração do SnCl_2	$8,90 \pm 0,31$
Concentração do HNO_3	$6,97 \pm 0,31$
Vazão da amostra	$3,00 \pm 0,31$

Os efeitos calculados demonstraram que os três fatores são estatisticamente significativos na geração de vapor para as condições experimentais estabelecidas.

No entanto, o efeito significativo da interação vazão e concentração de cloreto estanhoso, sugere que a variável vazão pode ser fixada, de acordo com a Figura 2.9, onde está apresentado um gráfico das médias marginais para o comportamento desse efeito de interação.

De acordo com esse gráfico, a falta de paralelismo entre as linhas confirma o efeito de interação e revela que concentrações mais altas de cloreto estanhoso oferecem uma melhor resposta. Como não há uma variação muito significativa na resposta utilizando a vazão mais alta ou mais baixa (linhas vermelha e azul, respectivamente) frente a uma concentração mais alta de cloreto estanhoso, fixou-se a vazão no seu valor médio, mediante ao exposto e a dados da literatura.

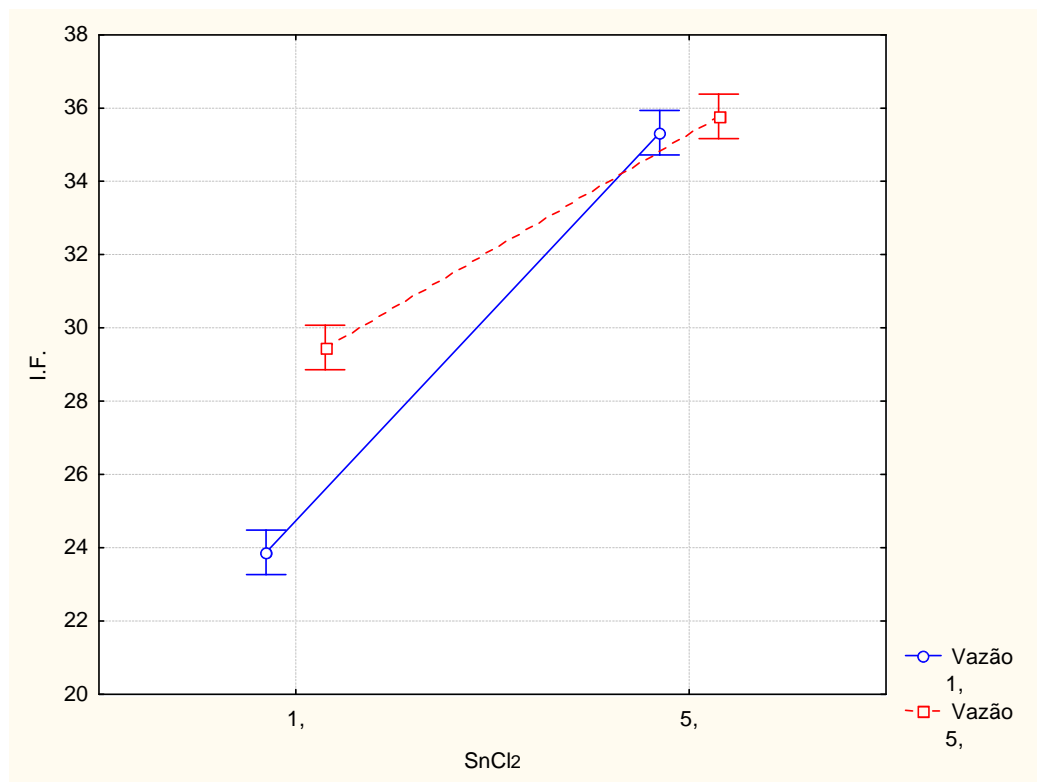


Figura 2.9: Gráfico das médias marginais para o efeito de interação cloreto estanhoso e vazão da amostra para um nível de confiança de 95%.

O teste de curvatura foi aplicado nos resultados obtidos a partir do planejamento fatorial completo a fim de avaliar o comportamento do sistema na região do ponto central. Dessa forma, foi possível verificar a existência ou não da condição de máximo nesta região. A equação 2.2 foi empregada para fins de cálculo:

$$\text{Curvatura} = R_{FD} - R_{CP} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Onde, R_{FD} é a média das respostas obtidas a partir dos experimentos realizado para o planejamento fatorial e R_{CP} é a média das respostas obtidas para o ponto central.

Uma análise dos resultados, $R_{FD} = 31,12$, $R_{CP} = 35,78$ sugeriu uma curvatura negativa. Isso revela a existência de uma região máxima de sinal analítico de fluorescência próxima das condições experimentais do ponto central.

Desta forma, sabendo-se quais são as variáveis e interações que apresentam maiores efeitos na resposta do sistema e considerando que os testes de curvatura e

de falta de ajuste deram significativos, partiu-se para a execução do planejamento Doehlert e desta forma, encontrar os valores ótimos para sua operação.

2.5.3 OTIMIZAÇÃO USANDO O PLANEJAMENTO DOEHLERT

Através dos resultados do planejamento fatorial completo, observou-se que as variáveis concentrações do SnCl_2 e concentração do HNO_3 apresentaram efeitos significativos e como o sistema apresentou uma curvatura significativa, houve a necessidade de uma otimização final para verificar a possibilidade de encontrar valores críticos na região experimental. Isso porque o planejamento fatorial completo gera equações de primeira ordem e como consequência não fornece condições ótimas para as variáveis estudadas.

O planejamento Doehlert é uma alternativa bastante útil em relação aos outros planejamentos experimentais. Uma importante propriedade desse planejamento é o número de níveis que cada variável possui, permitindo avaliar as variáveis que apresentam efeitos mais pronunciados em um número maior de pontos da região estudada. Além disso, este tipo de planejamento necessita de um número menor de experimentos em relação a outros planejamentos, como por exemplo, o planejamento composto central, sendo, portanto, mais eficiente, considerando que a eficiência de um modelo experimental é definida como o número de coeficientes dividido pelo número de experimentos.

Apesar das matrizes do planejamento Doehlert não serem ortogonais nem rotacionais, elas não apresentam divergência que possam comprometer a sua qualidade. Este planejamento permite estudar a superfície de resposta por meio da estimativa de parâmetros do modelo quadrático e assim obter a região em que os valores ótimos das variáveis estudadas são simultaneamente obtidos [58].

Aos dados experimentais obtidos pela aplicação do planejamento Doehlert foram ajustados modelos matemáticos para descrição do sistema. Emprega-se para este fim, funções polinomiais lineares ou quadráticas para modelagem e mapeamento da superfície de resposta obtida para se encontrar o ponto ótimo desejado. Pode-se também trabalhar as variáveis em sua forma codificada de

maneira que suas grandezas não interfiram no desenvolvimento do processo de otimização. Os sete experimentos, requeridos pela matriz Doehlert são mostrados na Tabela 2.7, onde se pode observar que a concentração do HNO_3 variou de 6,0 a 10% (v/v) e a concentração do SnCl_2 de 1,0 a 5,0% (m/v).

Tabela 2.7: Matriz Doehlert para a otimização final das concentrações de HNO_3 e SnCl_2 .

Experimento	Valores reais		Valores codificados		I.F
	[HNO_3]	[SnCl_2]	[HNO_3]	[SnCl_2]	
1	6,00	4,00	-0,866	0,500	18,55
2	8,00	5,00	0,000	1,00	20,32
3	10,0	4,00	0,866	0,500	16,45
4	8,00	3,00	0,000	0,000	37,10
5	6,00	2,00	-0,866	-0,500	28,96
6	8,00	1,00	0,000	-1,00	21,43
7	10,0	2,00	0,866	-0,500	18,34
8	8,00	3,00	0,000	0,000	36,72
9	8,00	3,00	0,000	0,000	37,22

Os resultados obtidos foram processados pelo programa STATISTICA e o valor ótimo foi caracterizado como um ponto de máximo para concentrações de HNO_3 em 7,75% e SnCl_2 2,85%. A Figura 2.10 mostra a superfície de resposta obtida, revelando os pontos críticos. As coordenadas destes pontos são as proporções dos componentes que geram a maior resposta para o sistema

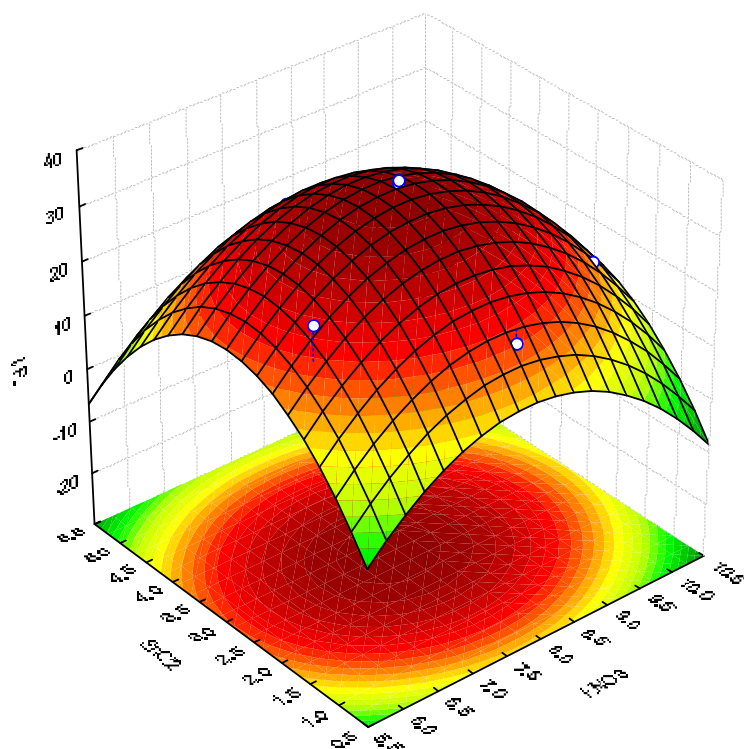


Figura 2.10: Superfície de resposta para o planejamento Doehlert.

Tabela 2.8: Tabela da ANOVA dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 2.7.

	SQ	GI	MQ	F	Valor p
HNO ₃ (L)	40,4496	1	40,4496	593,683	0,001680
HNO ₃ (Q)	328,2198	1	328,2198	4817,316	0,000208
SnCl ₂ (L)	17,5692	1	17,5692	257,865	0,003856
SnCl ₂ (Q)	312,5350	1	312,5350	4587,108	0,000218
Falta de ajuste	39,0169	2	19,5085	286,328	0,003480
Erro puro	0,1363	2	0,0681		
SQ total	631,1743	8			

SQ: soma quadrática; gl: graus de liberdade; MQ: média quadrática; Valor p: nível de probabilidade;

O modelo matemático que apresenta a relação entre os fatores envolvidos na otimização (concentração de HNO₃ e concentração de SnCl₂) com a intensidade de fluorescência, está representado abaixo pela equação 2.3, sendo que todos os termos foram significativos.

(Equação 2.3)

$$\text{I.F.} = -181,4079 + 48,0250(\text{HNO}_3) - 3,1009(\text{HNO}_3)^2 + 22,9975 (\text{SnCl}_2) - 4,0346(\text{SnCl}_2)^2.$$

A derivação desse modelo para as variáveis envolvidas resulta no sistema de equações:

$$\frac{\partial(\text{I.F.})}{\partial(\text{HNO}_3)} = 48,0250 - 6,2018(\text{HNO}_3) = 0 \quad (\text{Equação 2.4})$$

$$\frac{\partial(\text{I.F.})}{\partial(\text{SnCl}_2)} = 22,9975 - 8,0692(\text{SnCl}_2) = 0 \quad (\text{Equação 2.5})$$

Resolvendo este sistema de equações, encontra-se uma condição de máximo para a intensidade de fluorescência, dentro da região experimental estudada, para cada fator. Esses valores correspondem a uma concentração de 7,74 % (v/v) de HNO₃ e 2,85% (m/v) de SnCl₂.

Como revela a Tabela 2.8, o modelo demonstrou falta de ajuste. Este fato está supostamente relacionado à precisão dos pontos centrais e assim o erro ter se mostrado baixo. Isso faz com que qualquer variação dentro do sistema dê uma falta de ajuste, mesmo com os experimentos demonstrando o contrário.

A partir da interpretação dos dados, usou-se como valores ótimos para o sistema concentrações de HNO₃ em 8,0 % e SnCl₂ em 3,0%, por uma melhor facilidade no preparo das soluções e pelo sistema mostrar-se robusto de acordo com teste apresentado no subitem 2.5.5.6 .

Considerando os resultados obtidos, as condições experimentais estabelecidas para a determinação de mercúrio por CV-AFS-MSFIA estão apresentadas na Tabela 2.9.

Tabela 2.9: Condições experimentais empregadas para determinação de mercúrio em amostras de arroz por CV-AFS-MSFIA.

Variável	Condição experimental
Concentração SnCl ₂	3,0% (v/v)
Concentração HNO ₃	8,0% (v/v)
Vazão da amostra	3,0 mL min ⁻¹

2.5.4 MONTAGEM DO SISTEMA MSFIA E OTIMIZAÇÃO DO TUBO REACIONAL

Sistemas MSFIA combinam as vantagens de metodologias de sistemas FIA com a versatilidade, robustez e economia de reagentes dos sistemas SIA.

O SnCl₂ foi escolhido como agente redutor, devido ao seu baixo custo quando comparado, por exemplo, ao NaBH₄. Além disso, o SnCl₂ não gera H₂ durante o processo de redução do mercúrio, o que poderia ocasionar uma diminuição no sinal analítico por fluorescência [59].

A fim de remover o excesso de líquido que, porventura, pudesse existir no separador gás líquido uma microbomba solenóide foi utilizada. A microbomba possui uma frequência de pulso com alta reprodutibilidade o que garante a realização de taxas de fluxo estáveis.

O argônio foi escolhido como gás carreador. Este tem sido o gás mais utilizado como carreador para medidas por fluorescência, devido ao fato de não reduzir a eficiência na transferência de energia ou absorção dos fótons o que poderia resultar no efeito de supressão do sinal analítico [23].

Os valores selecionados para os parâmetros do sistema em fluxo em termos de sensibilidade e reprodutibilidade foram baseados na literatura.

Para evitar uma maior diluição da amostra uma seringa de 2,5 mL foi usada para dispensar o reagente redutor. Multiseringas permitem dispensar simultaneamente amostra e reagentes. Esta característica permite obter uma adequada mistura das soluções. Posteriormente, a mistura é transportada para a

bobina de geração de vapor a uma vazão de 12 mL min^{-1} para evitar diluição da fase líquida em um grande volume de argônio, obtendo assim uma maior sensibilidade.

A fim de determinar o melhor tamanho do tubo que funciona como bobina de reação, diferentes comprimentos, entre um e seis metros, foram testados. Para isso, foram usadas soluções de mercúrio $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, água como solução carreadora e $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em HCl 3,0% (v/v) sendo estas as condições iniciais obtidas por Leal *et al.*, [26]. Uma bobina de pulverização e gás argônio a uma vazão de 300 mL min^{-1} foram usados para obtenção do sinal.

Os resultados, apresentados na Figura 2.11, indicam que o aumento no comprimento do tubo produz um acréscimo no sinal analítico até um tamanho de três metros. Isto é semelhante ao comportamento observado por Reis *et al.*, [60,61], Leal *et al.*, [62] e Galignani *et al.*, [63] em seus trabalhos. Este fato revela que o aumento do tubo reacional provoca uma maior dispersão da amostra enquanto que tubos muito curtos não são eficazes para que ocorra a mistura amostra/reagentes.

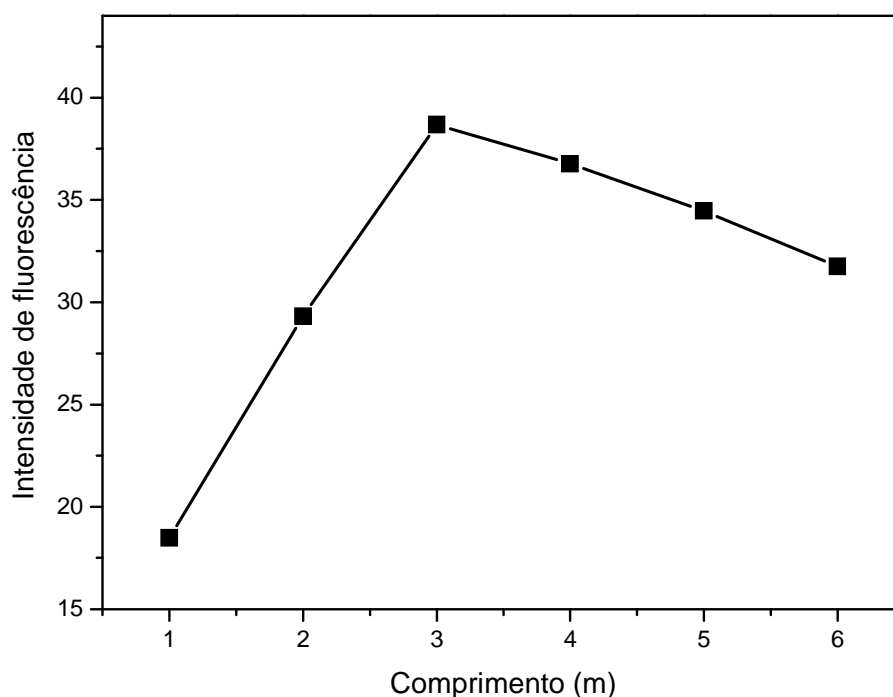


Figura 2.11: Efeito do sinal analítico em diferentes comprimentos do tubo reacional.

2.5.5 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

2.5.5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ E ESCOLHA DA TÉCNICA DE CALIBRAÇÃO

O procedimento mais simples e convencional para a determinação de metais em amostras é através da construção de curvas analíticas em meio aquoso. Entretanto isso nem sempre é possível. A principal dificuldade encontrada está relacionada à ocorrência de interferências causadas pelos concomitantes presentes na matriz e que não estão presentes na solução aquosa dos brancos e padrões.

Uma das estratégias utilizadas neste trabalho para avaliar a viabilidade de calibração aquosa foi observar a razão entre os coeficientes angulares das calibrações obtidas em meio aquoso e em meio da amostra. A comparação dos coeficientes angulares (b), observados para os gráficos de correlação, obtidos nas diferentes condições, pode ser utilizado para estimar o efeito causado pela matriz. Na ausência de efeito de matriz, a razão entre os coeficientes angulares, obtidos para soluções aquosas e amostra, devem ser de, aproximadamente 1 [64]. Assim, esta condição permite a avaliação do uso de calibração com soluções aquosas para análise de amostras de arroz.

Dessa forma, para verificar a existência de efeito de matriz na determinação de mercúrio, após o estabelecimento das melhores condições analíticas obtidas para o sistema, foram construídas curvas analíticas utilizando o método da calibração por adição de padrão na própria amostra e os coeficientes angulares foram comparados com aqueles das medidas diretas em solução aquosa. Para isso, adicionaram-se alíquotas adequadas de mercúrio nas amostras de arroz após o processo de digestão, de forma que fossem obtidas amostras com concentrações equivalentes aos seguintes pontos da curva analítica 0; 0,10; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A Figura 2.12 mostra as curvas analíticas obtidas para o mercúrio em solução aquosa e na presença da amostra. Comparando-se as curvas analíticas obtidas, observa-se que estas não apresentam diferenças significativas nas inclinações (Tabela 2.10). Esses resultados demonstram que a determinação de mercúrio

utilizando o método proposto pode ser realizada usando a técnica de calibração externa usando padrões aquosos.

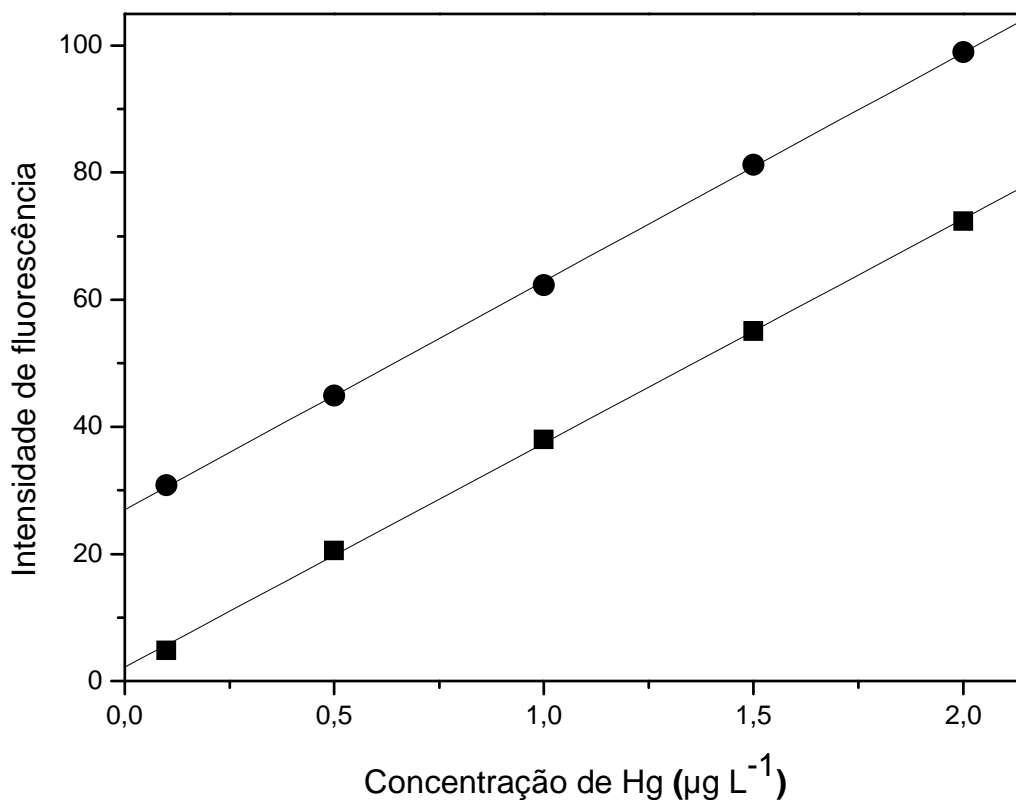


Figura 2.12: Curvas analíticas de calibração por meio de (-●-) adição do analito e em (-■-) solução aquosa para determinação de mercúrio em amostra de arroz.

Tabela 2.10: Inclinação das curvas analíticas ($L \mu g^{-1} \pm s$)

Técnica Analítica	Inclinação
Calibração externa	$35,287 \pm 1,61562$
Adição do analito	$35,989 \pm 0,94089$

2.5.5.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os limites de detecção e quantificação são os fatores mais críticos em um método para análise de traços de forma que, se o método julgado não atender este requisito todos os outros fatores serão irrelevantes.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada por um determinado método analítico, mas não necessariamente quantificada, ou seja, é a menor concentração que proporciona um sinal no instrumento significativamente diferente do sinal de um branco [65]. Existem várias maneiras de calcular o LD, no entanto, a IUPAC recomenda expressá-lo matematicamente como três vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco obtidos de 20 a 30 determinações, dividido pela inclinação da curva analítica [66], como mostra a Equação 2.6.

$$LD = \frac{3s}{a} \quad (\text{Equação 2.6})$$

Onde s é o desvio padrão e a é o coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) é definido como o nível acima do qual resultados quantitativos podem ser obtidos com um grau específico de confiança. É matematicamente expresso como dez vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco obtido de 20 a 30 determinações, dividido pelo coeficiente angular (b) da curva analítica (Equação 2.7).

$$LQ = \frac{10s}{a} \quad (\text{Equação 2.7})$$

Como mostra a Tabela 2.11, observa-se excelente limite de detecção e quantificação para determinação de mercúrio em amostras de arroz pelo método proposto.

Tabela 2.11: Limites de detecção e quantificação para determinação de mercúrio por MSFIA-CV-AFS.

Parâmetro	Valor
Limite de detecção (LD)	0,48 ng g ⁻¹
	0,009 µg L ⁻¹
Limite de quantificação (LQ)	1,61 ng g ⁻¹
	0,032 µg L ⁻¹

O limite de quantificação (LQ) obtido neste trabalho é inferior ao valor estabelecido pela legislação Brasileira (10 ng g⁻¹) e pela União Européia (1,6 ng g⁻¹), como limite máximo de tolerância de mercúrio, o que assegura uma determinação confiável do seu teor em amostras de arroz.

A grande sensibilidade inerente à técnica de análise usada permitiu a determinação de mercúrio sem a necessidade de aplicação de processos demorados de pré-concentração possibilitando assim a obtenção de melhor LD aos valores encontrados por da Silva [51], Li [49] e Silva [20] em amostras de arroz.

O limite de quantificação (LQ) determinado é menor do que os teores normalmente encontrados em arroz, revelando assim a eficiente aplicabilidade deste método.

2.5.5.3 LINEARIDADE

A linearidade de um método é expressa pela capacidade que este tem em responder proporcionalmente às concentrações das espécies dentro de uma determinada faixa.

Para a determinação da linearidade recomenda-se o uso de pelo menos cinco níveis de concentração do analito diferentes [67].

O coeficiente de correlação linear (R) e o coeficiente de determinação (R²) são usados para avaliar o quanto a reta pode ser adequada como modelo

matemático. O critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação varia entre os guias de validação de 0,90 a 0,99.

Para se obter o valor de R é preciso criar uma relação matemática que possa estabelecer a correlação entre o sinal analítico obtido e soluções do metal com concentrações conhecidas. Esta relação matemática pode ser expressa pela equação da reta ($y = ax + b$), conhecida como equação da curva analítica.

O método proposto neste trabalho apresentou uma faixa linear que se estendeu de 0,032 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, a qual corresponde em termos de ng g^{-1} a faixa de 1,61 a 500 para a determinação de mercúrio em arroz.

A faixa linear de trabalho do método proposto foi de 0,032 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, que corresponde a uma faixa de 1,61 a 1000 ng g^{-1} .

A equação 2.8 demonstra a curva analítica obtida para determinação de mercúrio usando padrões aquosos (Figura 2.12). O coeficiente de correlação linear obtido ($R=0,9994$) indicou uma adequada linearidade, confirmando assim uma das características de desempenho do método.

$$\text{IF} = 2,1504 + 35,287 [\text{Hg}] \quad (\text{Equação 2.8})$$

2.5.5.4 PRECISÃO

A precisão é um parâmetro que avalia o grau de dispersão de resultados de ensaios independentes obtidos pela repetição de uma mesma amostra ou de padrões aquosos, em condições bem definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la é por meio da repetitividade, que avalia a concordância entre resultados independentes obtidos pelo mesmo método e sob as mesmas condições de medição e da reprodutibilidade, que avalia a concordância entre resultados independentes obtidos sob diferentes condições de medição.

A precisão é usualmente expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD%). A mesma é calculada através da razão entre o desvio padrão das medidas

de uma mesma concentração (s) e a média das medidas dessa concentração (X_m), sendo expresso normalmente em porcentagem (Equação 2.9).

$$RSD\% = \left(\frac{s}{X_m} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 2.9})$$

A precisão é um parâmetro geralmente dependente da concentração do analito e em virtude disso se faz necessário a sua determinação para diferentes concentrações do analito [68]. Deste modo, a precisão expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD%), calculado a partir de 10 medidas consecutivas foi de 1,56 e 3,28% para amostras de arroz com concentrações de mercúrio de 3,63 e 5,81 ng g⁻¹, respectivamente.

2.5.5.5 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico é confirmada pela proximidade dos resultados individuais encontrados em um determinado ensaio, em relação a um valor verdadeiro de referência aceito como o mais provável. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaios, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico são: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais, comparação de métodos, ensaios de adição e recuperação. Neste trabalho, a exatidão do método foi avaliada através da análise de material de referência certificado de farinha de arroz NIST 1568a. Aplicando o método proposto encontrou-se uma concentração de mercúrio concordante com o valor certificado, como mostra a Tabela 2.12, conferindo assim exatidão ao método. O material certificado foi preparado do mesmo modo das amostras de arroz utilizando uma massa de aproximadamente 0,50 g.

Tabela 2.12: Determinação de mercúrio total em material certificado (n=3).

Material de referência	Concentração de mercúrio	
	Valor certificado	Valor encontrado
NIST 1568a	5,8 ± 0,5 ng g ⁻¹	5,3 ± 0,2 ng g ⁻¹

A exatidão foi também avaliada mediante teste de adição/recuperação que consiste na recuperação do analito após análise de amostras nas quais foram adicionadas quantidades conhecidas do mesmo (Tabela 2.13). A recuperação foi calculada através da equação 2.10:

$$R (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2.10})$$

Onde: C₁ = concentração determinada na amostra adicionada; C₂ = concentração determinada na amostra não adicionada; C₃ = concentração adicionada.

Tabela 2.13: Teste de adição e recuperação de Hg em amostras de arroz (n = 3).

Amostra	[Hg] (ng g ⁻¹)	Hg (ng g ⁻¹)		Recuperado (%)
		Adicionada	Encontrado	
2	3,63 ± 0,27	4,0	7,38 ± 0,57	96,7
		6,0	9,48 ± 0,23	98,4
7	6,41 ± 0,43	4,0	10,27 ± 0,21	98,6
		6,0	12,19 ± 0,18	98,2
9	2,04 ± 0,18	4,0	5,90 ± 0,16	97,7
		6,0	7,96 ± 0,21	99,0

2.5.5.6 ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico é definida por sua capacidade de produzir resultados constantes, quando são realizadas pequenas mudanças em suas condições ótimas de operação [69].

O sistema para determinação de mercúrio por MSFIA-CV-AFS apresenta melhores respostas quando são utilizadas as seguintes condições: concentração de ácido nítrico 8% (v/v), concentração do cloreto estanhoso 3% (m/v) e vazão da amostra 3 mL min⁻¹. Assim, para avaliar o comportamento do sistema, quando realizadas pequenas mudanças nas condições ótimas de operação, foi feito o ensaio de robustez.

A avaliação da robustez a 20% de modificação dos valores nominais do sistema MSFIA para determinação de mercúrio em amostras de arroz foi realizada através de um planejamento fatorial completo (2²) e os resultados interpretados a partir de uma análise de variância (ANOVA). O ponto central do planejamento foi corrido em triplicata pelo sistema para possibilitar uma estimativa do erro e para averiguar se as modificações causam curvatura no modelo. A Tabela 2.14 apresenta as variáveis experimentais e seus valores, obtidos através da variação de ± 20% em torno dos valores críticos.

A variável vazão da amostra não foi incluída no ensaio de robustez, visto que dentro do domínio experimental estudado anteriormente não houve uma variação significativa na resposta analítica ao se fazer uso de uma vazão mais alta ou mais baixa para o sistema proposto.

Tabela 2.14: Níveis das variáveis experimentais para o estudo da robustez a 20% de modificação.

Variável	Valor mínimo (-)	Valor máximo (+)	Ponto central
Concentração do HNO ₃ % (v/v)	6,4 %	9,6 %	8,0 %
Concentração do SnCl ₂ % (m/v)	2,4 %	3,6 %	3,0 %

A Tabela 2.15 apresenta a matriz de planejamento com as respostas em termos de intensidade de fluorescência. Os resultados foram tratados no programa *STATISTICA 8.0* com nível de confiança a 95 %.

O diagrama de Pareto indicou, como mostra a Figura 2.13, que as modificações a 20% dos valores nominais não apresentaram efeitos significativos para as variáveis estudadas, revelando assim que as variáveis são robustas à percentagem estudada.

Tabela 2.15: Matriz do planejamento fatorial completo (2^2) com valores reais e codificados.

Experimento	[HNO₃]	[SnCl₂]	Int. fluorescência
01	+1 (9,6)	+1 (3,6)	28,52
02	+1 (9,6)	-1 (2,4)	28,34
03	-1 (6,4)	+1 (3,6)	27,98
04	-1 (6,4)	-1 (2,4)	28,41
Ponto Central			
05	0 (8,0)	0 (3,0)	28,33
06	0 (8,0)	0 (3,0)	27,86
07	0 (8,0)	0 (3,0)	28,29

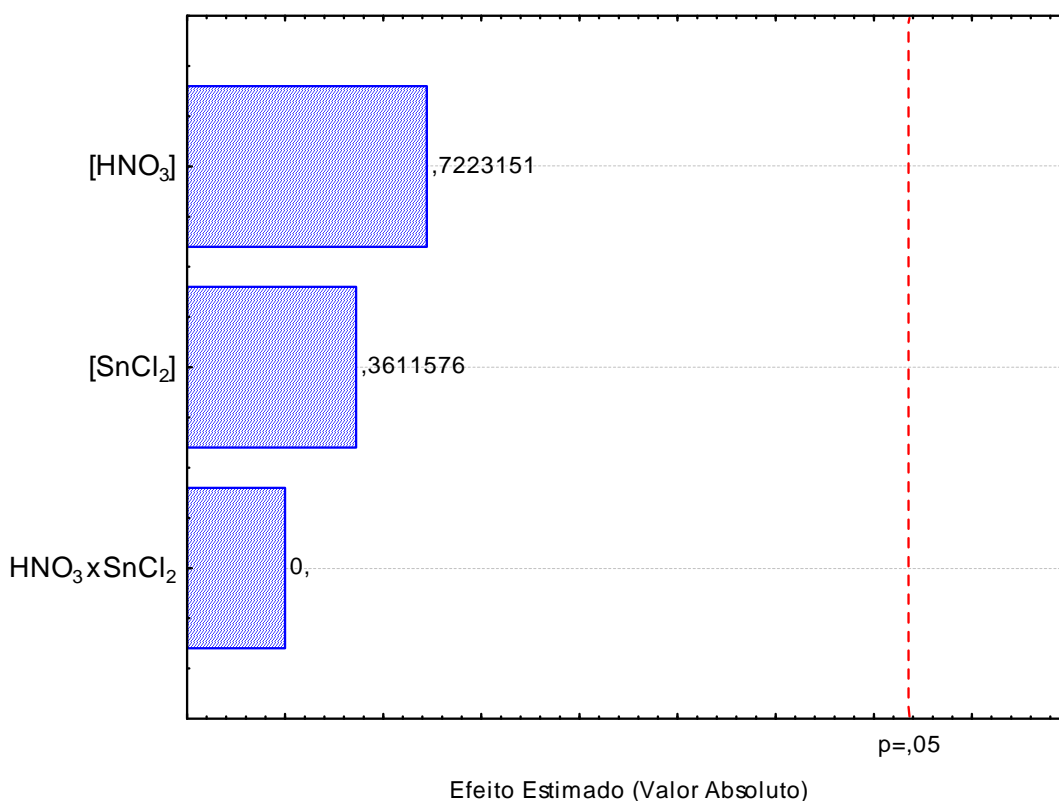


Figura 2.13: Diagrama de Pareto para avaliação da robustez a 20% de modificação dos valores nominais.

2.5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

O método proposto para determinar a concentração de mercúrio foi aplicado em amostras de arroz com uma frequência analítica de 30 injeções por hora, visto que foi realizada uma injeção a cada 2 minutos. Os resultados, expressos com intervalo de confiança (ao nível de 95%), são apresentados na Tabela 2.16.

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com dados reportados na literatura, apresentando teor de mercúrio em arroz entre 2,15 a 7,25 ng g⁻¹.

A União Européia (UE) fixa os teores máximos de determinados contaminantes em alimentos, de forma a reduzir a presença desses contaminantes a níveis tão baixos para estimular a realização de boas práticas de produção agrícola.

Dessa forma, eleva-se a proteção da saúde pública, em especial para os grupos sensíveis da população como crianças e pessoas alérgicas.

As concentrações de mercúrio nas amostras analisadas mostraram-se inferiores ao limite máximo de tolerância de mercúrio permitido em alimentos pela União Européia, considerado com sendo igual a $1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corporal [70].

Tabela 2.16: Determinação de mercúrio em amostras de arroz por MSFIA-CV-AFS (n=3). P: arroz parboilizado; W: arroz branco.

Amostra	Tipo de arroz	Concentração Hg (ng g^{-1})[*]	Precisão (RSD %)
01	P	$4,81 \pm 0,52$	6,41
02	P	$3,63 \pm 0,27$	4,42
03	P	$5,14 \pm 0,45$	5,20
04	W	$4,65 \pm 0,31$	3,89
05	W	$6,41 \pm 0,43$	4,01
06	P	$2,92 \pm 0,14$	2,90
07	P	$2,15 \pm 0,16$	4,31
08	W	$3,94 \pm 0,08$	1,28
09	W	$7,25 \pm 0,36$	2,93
10	W	$2,76 \pm 0,18$	3,98
11	P	$4,30 \pm 0,22$	3,02
12	P	$5,82 \pm 0,12$	1,20

^{*}Resultados expresso com intervalo de confiança de 95%.

2.5.7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O sistema MSFIA-CV-AFS desenvolvido permitiu a determinação de mercúrio em amostras de arroz de forma automatizada e com excelente frequência analítica em relação a outros métodos usualmente empregados para a determinação de mercúrio.

A utilização da bureta multisinga movendo-se simultaneamente, permitiu que amostra e reagentes fossem adicionados paralelamente, possibilitando assim, uma melhor mistura dos mesmos. Além disso, a contaminação de amostras e reagentes foi minimizada por se tratar de um sistema fechado.

O software Autoanalysis, empregado para o controle do sistema automático, conferiu uma elevada precisão e reprodutibilidade ao procedimento.

O método proposto ofereceu inúmeras vantagens como adequada exatidão, sensibilidade, baixos limites de detecção e quantificação, o que permitiu a determinação de mercúrio em arroz em nível de traços (ng g^{-1}).

O sistema possibilitou uma redução considerável no consumo de amostras e reagentes, uma vez que estes são injetados no sistema apenas no momento da determinação analítica, gerando menos resíduos e menor custo por análise.

O emprego do planejamento fatorial foi útil para o estabelecimento das variáveis significativas bem como as suas interações.

As concentrações de mercúrio nas amostras analisadas apresentaram valores abaixo dos limites máximos estabelecidos pela legislação espanhola.

- **Determinação de cádmio em arroz por espectrometria de atomização eletrotérmica usando alumínio como modificador permanente**

3.1 INTRODUÇÃO

Diante da necessidade de se determinar com precisão e exatidão concentrações cada vez menores de espécies químicas, tem-se observado o desenvolvimento de novas técnicas analíticas instrumentais. Tratando-se da determinação de elementos químicos, aspecto de grande importância em estudos geológicos, clínicos e ambientais, a espectrometria atômica ocupa um lugar de destaque [71].

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite tem sido uma das técnicas mais utilizadas na determinação de elementos em nível de traços por apresentar alta sensibilidade e boa seletividade [72].

Todavia, elementos como o cádmio apresentam sérias dificuldades em serem determinados através dessa técnica. Essas dificuldades estão relacionadas ao fato do cádmio ser bastante volátil, o que pode ocasionar facilmente a sua perda. Além disso, este metal pode interagir facilmente com o grafite e provocar interferências de matriz [16].

Com o propósito de superar esses problemas foi introduzido o conceito denominado STPF (*Stabilized temperature platform furnace*) que inclui uma série de condições para uma análise praticamente livre de interferências. Dentro desse conceito está a utilização dos modificadores químicos, que visam evitar a volatilização do elemento de interesse antes da etapa de atomização, bem como diminuir interferências de matriz.

O interesse na determinação de cádmio em nível traços tem aumentado nos últimos anos como consequência da exposição ocupacional e ambiental, ou dos distúrbios causados por este elemento, induzido por situações especiais de doença como, por exemplo, a insuficiência renal em fase terminal [73].

O cádmio é um metal de elevado potencial tóxico, que não possui função dentro dos organismos e sua acumulação pode provocar graves doenças mesmo em baixos teores [17]. A contaminação de organismos aquáticos possibilita sua entrada na cadeia alimentar do homem. Assim, o cádmio atinge o corpo humano através da ingestão de alimentos, mas também através da respiração, e em raros casos por vias cutâneas [74].

Dessa forma, o cádmio pode acumular-se no arroz, principalmente no arroz cultivado em água de irrigação contaminada pela mineração ou por outras operações industriais, e a exposição crônica pode levar à intoxicação que causa o amolecimento dos ossos e insuficiência renal.

Assim, neste trabalho o cádmio foi escolhido por não apresentar, até os dias atuais, nenhuma função no organismo e baixíssima tolerância para ingestão diária. Esse metal, por não apresentar função fisiológica, é suspeito de ser cancerígeno [75].

Este trabalho apresenta a primeira aplicação do alumínio como modificador permanente, e propõe um método para a determinação de cádmio em amostras de arroz adquiridos em supermercados de Salvador, Brasil, utilizando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS).

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a concentração de cádmio em amostras de arroz comercializado na cidade de Salvador-BA por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite utilizando alumínio como modificador químico.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um planejamento fatorial completo de dois níveis para investigar preliminarmente o uso do alumínio como modificador químico;
- Otimizar as temperaturas de aquecimento do forno de grafite para cádmio diante do uso dos modificadores químicos fosfato de amônio, paládio e alumínio, bem como em sua ausência;
- Investigar o uso do alumínio como modificador químico permanente;
- Otimizar a massa de alumínio a ser empregada como modificador químico permanente para a determinação de cádmio em amostras de arroz;
- Validar o método proposto através de amostras certificadas;
- Avaliar se a concentração de cádmio presente nas amostras de arroz comercializadas na cidade de Salvador-Ba, estão dentro dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira.

3.3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.3.1 O ELEMENTO QUÍMICO CÁDMIO

O cádmio (Cd) é o segundo elemento químico pertencente à família 12 da classificação periódica dos elementos. Apresenta número atômico 48 e massa igual a 112,4 u. À temperatura ambiente encontra-se no estado sólido. Possui temperatura de fusão igual a 321,07 °C e temperatura de vaporização igual a 767 °C . É um metal branco azulado, dúctil e maleável. Seu estado de oxidação mais comum é o Cd^{+2} , podendo apresentar o estado de oxidação Cd^{+1} , no entanto, é muito instável [76].

3.3.1.1 OCORRÊNCIA E USOS

O cádmio é encontrado em quantidades traços na maioria dos minérios de zinco, sendo um metal onipresente, porém relativamente raro. Sua abundância na crosta terrestre, em peso, é cerca de 0,16 g t⁻¹, fazendo parte de aproximadamente $5,0 \times 10^{-5}$ %. É o 65º em ordem de abundância relativa.

Este metal em sua forma pura é amplamente usado nos mais diversos processos industriais tais como pigmento e estabilizante em tintas, componente de coberturas anticorrosivas, ligas metálicas, na manufatura de PVC, em baterias empregadas em locomotivas a diesel, em pilhas recarregáveis usadas em telefones celulares, além de outros equipamentos eletrônicos. O cádmio pode ainda ser encontrado em fertilizantes para a agricultura a base de fosfato e em esgotos industriais [77]. As principais formas de exposição ao cádmio são ar, água e alimentos.

Apesar do corpo de um adulto conter cerca de 30 mg de cádmio, é considerado um elemento não essencial e altamente tóxico. A sua ação tóxica é comparável com a do arsênio e mercúrio, no entanto, estima-se que o seu potencial letal é maior que para qualquer outro elemento [78]. A concentração de cádmio aumenta significativamente em fumantes comparado com não fumantes. Possui potencial carcinogênico e um número relativamente grande de seus compostos está

incluído em listas nacionais e internacionais onde-se estipula concentrações máximas no local de trabalho.

3.3.1.2 EXPOSIÇÃO HUMANA

A concentração de cádmio em diferentes meios ambientais varia consideravelmente. Essa concentração é relacionada com o íon bivalente do cádmio, Cd^{2+} .

O cádmio já foi descrito como um dos elementos traço mais perigosos para o homem [79]. Os riscos para a saúde são maiores quando há inalação desta espécie a partir de fontes ocupacionais e esta resulta diretamente em lesão pulmonar. Assumindo uma inalação diária de 20 m^3 de ar e que a concentração é similar em ambientes fechados e abertos, a quantidade média de cádmio inalado por dia por um ser humano na zona rural, urbana ou industrializada não deve exceder 0,01, 0,2 e 0,4 μg , respectivamente.

A água contém concentrações relativamente baixas de cádmio, normalmente entre $0,01 - 1 \mu\text{g L}^{-1}$. Concentração de até $5 \mu\text{g L}^{-1}$ já foi relatada ocasionalmente e, em raras ocasiões, até $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Em áreas poluídas, a concentração de cádmio pode ultrapassar $25 \mu\text{g L}^{-1}$ [80].

A concentração de cádmio está na faixa de $1-150 \mu\text{g kg}^{-1}$ em carne, peixe e frutas e, na faixa de $10 - 300 \mu\text{g kg}^{-1}$ em alimentos como trigo, arroz e batata. As maiores concentrações ($100 - 1000 \mu\text{g kg}^{-1}$) são encontradas em fígado e rins de mamíferos e em certas espécies de mexilhões, vieiras e ostras. Quando crescem em solo poluído com cádmio, algumas plantas, como o arroz, podem acumular grandes concentrações do metal (maior que $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Assim, para os não fumantes, os alimentos constituem a principal fonte ambiental de cádmio [24].

A ingestão média diária através dos alimentos em países europeus e nos Estados Unidos está entre $15 - 25 \mu\text{g}$, podendo variar de acordo com a idade e hábitos alimentares. No Japão, a média de ingestão está entre $40 - 50 \mu\text{g}$, mas pode ser bem maior em áreas contaminadas [24].

A *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)* recomenda um limite máximo diário de ingestão de cádmio tolerado para todas as fontes de 1,0 – 1,2 ‘g kg⁻¹ por massa corpórea [81].

Sabe-se que 50% dos íons cádmio presente no organismo humano se localizam nos rins, 15% no fígado e 20% nos músculos. O rim é o órgão alvo e o efeito principal do cádmio é a lesão renal [82].

Os efeitos de exposição sub-aguda, através da dieta ou de fontes ambientais, normalmente refletem sobre o rim como efeito de uma alta carga tóxica, e possivelmente também sobre o esqueleto.

A retenção de cádmio nos tecidos corpóreos está relacionada com a formação de cádmio-metalotioneína, um complexo de cádmio-proteína de baixo peso molecular [83]. Um exemplo do potencial tóxico do cádmio está na doença “Itai-itai”, síndrome observada em mulheres antes e após a Segunda Guerra Mundial no Japão [27]. A ingestão de cádmio através dos alimentos e bebidas pode resultar rapidamente em sintomas como náusea, dores abdominais e de cabeça. Diarréia e choque podem ocorrer. Cerca de 15 mg L⁻¹ de cádmio em um líquido são suficientes para causar tais sintomas. Além dos danos renais, o envenenamento por cádmio pode levar a uma doença nos ossos que os tornam quebradiços, podendo causar colapso do esqueleto. Evidências indicam que a exposição ao cádmio pode resultar em níveis mais elevados de câncer na população que o normal.

Em 1993, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) classificou o cádmio e seus compostos como Grupo 1 de carcinógenos humanos, tendo concluído que existiam evidências suficientes de que o cádmio é cancerígeno para humanos e animais. A evidência da carcinogenicidade em humanos foi baseada principalmente na observação da excessiva mortalidade por câncer no pulmão entre trabalhadores de uma indústria “recuperadora” de cádmio nos Estados Unidos e em indústrias de processamento de cádmio no Reino Unido [24].

3.3.2 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) é uma técnica bem estabelecida para determinações monoelementares. Essa técnica oferece uma sensibilidade adequada para determinações de íons metálicos presentes em amostras em nível de traços, sem necessidade de uma etapa prévia de concentração.

Esta técnica permite o uso de pequenos volumes de amostra (cerca de poucas dezenas de microlitros) e fornece limites de detecção menores que aqueles obtidos com a espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS).

A técnica de GF AAS permite a análise de amostras líquidas, dissolvidas ou sólidas. Para a determinação do analito, uma quantidade medida ou pesada da amostra é introduzida no forno de grafite e submetida a uma série de etapas de aquecimento. Dessa forma, é imprescindível estabelecer um programa de aquecimento apropriado para controlar tempo e temperatura das etapas de secagem, de pirólise e de atomização. Este programa otimizado permite evaporar o solvente, bem como eliminar os constituintes da matriz, antes da atomização do analito, a fim de reduzir eventuais interferências.

Durante as etapas de eliminação do solvente e da matriz é usado um fluxo de gás inerte, o qual é interrompido na etapa de atomização [110].

Cada elemento, numa determinada matriz, possui uma temperatura de pirólise e uma de atomização características, o que justifica a necessidade de encontrar tais parâmetros para uma determinada análise a fim de garantir a reprodutibilidade das medidas e diminuir a absorção de fundo (absorção não seletiva).

A GF AAS é uma das técnicas analíticas mais usadas e mais poderosas para a determinação de elementos em nível de traços e ultra-traços nas mais diversas amostras [110]. As áreas mais exploradas atualmente são de interesse ambiental, clínico e biológico.

Estas importantes características têm garantido a continuação do desenvolvimento e a aplicação da GF AAS para uma grande variedade de áreas da ciência desde sua introdução por L'vov, em 1959 [110].

3.3.2.1 MODIFICADORES QUÍMICOS

O uso de modificadores químicos é uma prática recorrente quando se utiliza a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

A utilização dos modificadores químicos nessa técnica baseia-se na remoção da matriz em uma etapa diferente daquela em que o analito é atomizado. Isso pode ser alcançado de duas maneiras: convertendo os compostos da matriz em substâncias mais voláteis ou diminuindo a volatilidade dos compostos do analito [84].

A seleção de um modificador químico apropriado para uma análise química é dependente dos mecanismos de ação do mesmo. Existe um grande número de processos químicos e físicos que ocorrem no sistema grafite – amostra - modificador químico. Isso leva a consideráveis contradições entre as descrições dos mecanismos de ação de modificadores químicos por diferentes autores.

Vários modificadores químicos permanentes têm sido utilizados para a determinação de cádmio.

Welz *et al.*, utilizaram uma mistura de tungstênio e irídio como modificador permanente para a determinação de cádmio em grãos utilizando amostragem direta de sólidos e espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR CS ETAAS) [85].

Em outro método para determinação de cádmio e chumbo, utilizou-se o tungstato como modificador permanente para a determinação destes metais em águas [86].

Silva *et al.*, recomendou o uso do paládio como modificador permanente para a determinação de cádmio e tálio em biodiesel [87]. Além disso, outro método, proposto para a análise de biodiesel, utilizou o tungstênio como modificador permanente para a determinação de cádmio e níquel [88].

A ET AAS foi utilizada para a determinação de cádmio em sedimentos e solos por amostragem de suspensão, e uma mistura de nióbio e irídio foi utilizada como modificador permanente em um trabalho realizado por Dobrowolsk [89].

A utilização de alumínio como modificador químico em ET AAS foi investigada por vários autores [90-55].

O primeiro trabalho a relatar a utilização do alumínio como um modificador químico em ET AAS foi publicado por Docekalova *et al.*, [42]. Nesse trabalho o alumínio e outros elementos foram avaliados como modificadores durante a determinação de selênio por ET AAS.

Em outro trabalho, Matsusaki *et al.*, empregou uma mistura de níquel e nitrato de alumínio, além de sal de amônio como modificador de matriz para a determinação de antimônio [91], telúrio e índio [92] por ET AAS.

Tsai *et al.*, avaliaram o cloreto de alumínio como modificador químico para a determinação de cobre [93] e cádmio [94] em ligas a base de níquel utilizando ET AAS.

Ma *et al.*, desenvolveram um método no qual utilizou-se alumínio e níquel como modificadores químicos para determinar a concentração de gálio em ligas de alumínio e em amostras de água doce. Os pesquisadores observaram que fazendo uso do alumínio como modificador, a sensibilidade melhorava em uma ordem de duas a três vezes [95].

Doner e Akman propuseram a utilização de sulfato de alumínio, como modificador de matriz para a determinação de zinco por ET AAS [96]. Em outros estudos, esses autores recomendaram a utilização de sulfato de alumínio como modificador para a determinação de ferro e zinco em amostras de trigo [97].

Wang *et al.*, também desenvolveram um método para a determinação de berílio em material particulado atmosférico por ET AAS, utilizando o alumínio como modificador da matriz [98].

Tuzen [99] investigou a mistura paládio e sulfato de alumínio como modificador para determinar chumbo, cádmio, cobre, ferro, manganês e zinco em amostras de líquens.

Carrion *et al.*, [100] avaliaram o desempenho do alumínio como modificador para a determinação de chumbo em ligas a base de alumínio por ET AAS. Eles observaram que o chumbo pode ser fortemente retido por alumínio em baixas temperaturas de pirólise (700°C) e, o sinal de absorvância integrada foi menor

quando o alumínio não estava presente. A retenção de chumbo também aumentou com a quantidade de alumínio adicionada.

Ince e Akman [101] avaliaram o efeito de sais de alumínio na determinação de manganês por ET AAS. Eles concluíram que os sais de alumínio formam compostos refratários de alumínio e manganês (a exemplo do $MnAl_2O_4$) e causam mudança nos sinais de absorção do manganês para temperaturas mais elevadas. Se a temperatura de pirólise for abaixo de 800 °C, o cloreto de alumínio altera o mecanismo de vaporização do manganês.

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa propôs a utilização de alumínio como modificador químico convencional para a determinação de chumbo em aguardente de cana-de-açúcar por ET AAS [102]. O trabalho demonstrou que o método apresentado é comparável à utilização de outros modificadores químicos recomendados para a determinação de chumbo.

3.3.2.1.1 MODIFICADORES QUÍMICOS CONVENCIONAIS

Na modificação química convencional, o modificador está presente em solução e é adicionado antes, depois ou conjuntamente com a amostra.

Um grande número de modificadores de matriz tem sido desenvolvido para a estabilização térmica do analito, permitindo que altas temperaturas de pirólise sejam alcançadas sem a perda do mesmo.

Dentre os modificadores mais empregados como convencionais incluem alguns íons de metais de transição, como por exemplo, Ni e Pd, que formam substâncias intermetálicas, termicamente estáveis, com os metalóides, como por exemplo, As-Ni, nitrato de magnésio e fosfato de amônio. São usados também como modificadores ácidos orgânicos, como o ascórbico, cítrico, oxálico e outros. São também empregadas a combinação de modificadores, sendo que a combinação mais comum é a do nitrato de magnésio com nitrato de paládio. Esse modificador misto rende excelentes resultados por apresentar um bom desempenho para a grande maioria dos elementos determinados por ETAAS [103], o que lhe conferiu, no começo dos anos 90, o título de "modificador universal". No entanto, o custo

dessa mistura é relativamente alto, principalmente pelo fato dos reagentes usados apresentarem alto grau de pureza, o que favoreceu a busca por outros reagentes.

Dentre as principais desvantagens do uso de modificadores convencionais pode-se citar:

- i) Tempo de análise maior [104];
- ii) Ação corrosiva no grafite causada por certos tipos de modificadores, como por exemplo, $\text{FeCl}_3 + \text{HNO}_3$, PO_4^{3-} e NH_4NO_3 [105].

3.3.2.1.2 MODIFICADORES QUÍMICOS PERMANENTES

Os modificadores químicos vêm sendo comumente empregados de forma permanente. Neste caso, o modificador encontra-se presente na superfície dos tubos de grafite de modo a causar um recobrimento parcial de uma área, a partir da deposição de espécies metálicas formadoras de carbetos. A impregnação do tubo ou plataforma com a solução modificadora pode ocorrer ainda, seguida de um tratamento térmico do tubo [106].

O grafite formador do tubo faz ligações com átomos de vários elementos entre as superfícies das lâminas de carbono, que se formam na sua estrutura cristalina. A impregnação do grafite com os elementos que formam carbetos estáveis e de alto ponto de fusão, altera favoravelmente a superfície do grafite através da competição pelos sítios ativos livres do carbono na superfície do forno [107].

Vários trabalhos relatados na literatura citam algumas vantagens observadas nas determinações por GF AAS utilizando a modificação química permanente, dentre elas: aumento no tempo de vida e o uso operacional dos atomizadores, reduz os efeitos de matriz e de absorção de radiação não específica, aumento da sensibilidade de muitos elementos de média e alta volatilidade e melhora da precisão dos resultados obtidos [108].

Para Volynsk [61], dentre os métodos utilizados para modificar tubos de grafite, o mais empregado consiste no tratamento de solução (injeção). Neste método introduz-se a solução de um metal refratário pelo orifício de introdução da amostra do tubo. Nesse caso, somente a superfície interna do tubo é revestida [109]. Segue-se uma etapa de secagem, e então, um ou mais ciclos de aquecimento a alta

temperatura, para formar a camada de carbeto metálico, tentando se eliminar, assim, o contato físico e portanto, a reação entre a superfície de grafite e o analito [110]. O tratamento pode ser realizado uma ou mais vezes a fim de se aumentar a espessura da camada protetora de carbeto metálico [112].

Pode-se citar dentre as principais vantagens dos modificadores químicos permanentes [111,112]:

i) Diminuição do tempo consumido para dispensar a amostra, tornando o programa mais rápido e simples;

ii) Eliminação das impurezas voláteis do modificador durante o processo de modificação da parede do tubo, que permite uma melhora do limite de detecção, minimizando o custo analítico pelo aumento da vida útil do tubo de grafite.

Alguns efeitos indesejáveis dos modificadores químicos são [67,68]:

i) Estabilização excessiva de alguns analitos e a formação de sinais múltiplos;

ii) Reagentes de alto custo, particularmente, R, Rh, Ru e terras raras.

3.4 PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

As determinações por ET AAS foram realizadas empregando um espectrômetro de absorção atômica ZEE nit 600 (*Analytik Jena AG*, Jena, Alemanha) equipado com um tubo de grafite aquecido transversalmente como atomizador e correção de fundo por efeito Zeeman. Tubos revestidos de grafite pirolítico com plataforma PIN foram utilizados com aquecimento transversal para todas as determinações.

Uma lâmpada de cátodo oco de cádmio (*Varian*, Mulgrave, VA, Austrália) foi utilizada como fonte de radiação com uma corrente de 3 mA (comprimento de onda 228.8 nm, banda espectral de 1,2 nm).

Um amostrador automático MPE 60 (*Analytik Jena*) foi usado para a introdução da amostra.

Argônio, com uma pureza de 99,997% (*White Martins*, Salvador, Brasil) foi utilizado como gás de purga com uma vazão interna de 2,0 L min⁻¹ durante todas as etapas, exceto durante a atomização, quando o fluxo interno foi interrompido. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e baseadas em absorvância integrada (integral da absorvância em função do tempo). Durante o desenvolvimento do método para determinação de cádmio em amostras de arroz os resultados foram expressos como a média de três replicatas.

Para pesagem das amostras utilizou-se uma balança analítica SARTORIUS, modelo BLD105.

3.4.2 REAGENTES

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura, obtida a partir de um sistema Milli-Q (*Millipore*, Bedford, EUA), com resistividade específica de 18 MΩ cm⁻¹.

Ácido nítrico (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e peróxido de hidrogênio (*Suprapur Merck*) foram utilizados na digestão das amostras de arroz.

As soluções padrão de cádmio utilizadas foram preparadas a partir de diluições adequadas de uma solução padrão estoque de cádmio 1000 mg L⁻¹ (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) em HNO₃ 0,5% (v/v).

A faixa de concentração da curva de calibração aquosa variou entre 1,0 a 5,0 µg L⁻¹. As mesmas foram preparadas diretamente pelo amostrador automático (AS-72 PE), através de diluições apropriadas de uma solução estoque. Para isso, utilizou-se solução contendo 5,0 µg L⁻¹ de uma solução de cádmio. Foi construída uma curva analítica por adição padrão nas amostras de arroz, realizando-se o mesmo procedimento para a calibração aquosa.

3.4.3 DESCONTAMINAÇÃO E ARMAZENAGEM DOS MATERIAIS

Os copos do amostrador automático, ponteiros das micropipetas, frascos e vidrarias utilizados para decomposição ou armazenamento das amostras e preparo das soluções de calibração foram previamente lavados com solução diluída de Extran (*Merck*). Posteriormente foram enxaguados com água deionizada e mantidos em solução de HNO₃ 10% (v/v) por no mínimo 24 horas. Após este período, foram enxaguados três vezes com água ultrapura e secos ao ar, em ambiente livre de poeira.

3.4.4 AMOSTRAS

Os estudos visando a determinação de cádmio foram feitos em trinta e quatro amostras de arroz adquiridas em supermercados da cidade de Salvador-Ba em março de 2011.

As amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno previamente descontaminados com solução de ácido nítrico 10% (v/v), por 24 horas, e lavados com água ultra pura para eliminação de metais interferentes. Em seguida, as

amostras foram guardadas em prateleira no laboratório, protegidas da luz e umidade.

3.4.4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE ARROZ

Primeiramente pesou-se com precisão de 0,001 g, aproximadamente, 0,5 g de amostra de arroz, parcialmente macerado em pequenos grãos, em tubos de digestão. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL de HNO₃ concentrado e 1,0 mL de H₂O₂ 30% (v/v) para digestão completa das amostras.

Os tubos foram colocados em um bloco digestor modelo TECNAL TE 040/25 (Figura 3.1) e, em seguida tampados com um aparato de vidro denominado “dedo frio” a fim de evitar evaporação excessiva do ácido durante aquecimento e prevenir a contaminação das amostras. As misturas foram aquecidas a 120 °C durante duas horas sob refluxo constante. A digestão de cada amostra foi realizada em triplicata, assim como ocorreu com o branco. Após a digestão, as amostras foram transferidas quantitativamente para recipientes de polietileno e foram diluídas para 10 mL utilizando água ultra pura.



Figura 3.1: Bloco Digestor (Tecnal TE-040/25) utilizado na digestão de amostras de arroz

A exatidão do método analítico, desenvolvido para a determinação dos elementos químicos, foi determinada mediante análise de material de referência certificado de farinha de arroz, adquirido do *National Institute of Standard and Technology* – NIST SRM 1568a (*Rice Flour*). O material foi submetido ao mesmo procedimento aplicado às amostras de arroz.

3.4.4.1.1 COCÇÃO EM FORNO MICRO-ONDAS

Aproximadamente 10 g de amostra de arroz foram pesadas e cozidas uma única vez em 20 mL de água ultrapura em forno de micro-ondas convencional da marca Sanyo modelo EM 604T com frequência de onda de 2450 MHz sob potência máxima (100 MHz). Posteriormente, a água de fervura foi desprezada. Utilizou-se o tempo de 12 minutos para a cocção da amostras de arroz.

3.4.5 USO DO ALUMÍNIO COMO MODIFICADOR QUÍMICO

3.4.5.1 REVESTIMENTO DA SUPERFÍCIE GRAFÍTICA UTILIZANDO O ALUMÍNIO COMO MODIFICADOR PERMANENTE

Antes das análises para a determinação de cádmio, a plataforma de L'vov foi tratada com alumínio como modificador permanente de acordo com um programa de aquecimento (Tabela 3.1) específico para a deposição permanente, indicado pelo fabricante do equipamento.

Para a deposição do alumínio como modificador permanente na plataforma de grafite, foram realizadas 10 injeções de 40 µL de uma solução padrão de alumínio (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 8% (v/v). A cada injeção, o programa de temperatura do forno de grafite (Tabela 3.1) era executado, resultando em uma massa depositada de 400 µg.

Tabela 3.1: Programa de temperatura para deposição do alumínio como modificador na plataforma de grafite

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (°Cs⁻¹)	Aquecimento(s)
Secagem 1	130	10	40
Secagem 2	160	10	50
Pirólise 1	1000	20	25
Atomização	1400	100	5
Limpeza	1700	100	5

3.4.5.2 ESTUDO COMPARATIVO DO ALUMÍNIO COM OUTROS MODIFICADORES QUÍMICOS

Nesta etapa do trabalho, realizou-se um estudo comparativo em relação ao uso do alumínio como modificador químico permanente e modificadores convencionais já bem estabelecidos na literatura para a determinação de cádmio. Nesse caso, as determinações foram feitas com a co-injeção de 15 µL da solução do modificador através do amostrador automático.

3.4.5.2.1 MODIFICADOR DE PALÁDIO

A solução modificadora de paládio adicionada junto a amostras de arroz foi preparada pela diluição de 0,5 mL da solução estoque ($10,00 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$) utilizando-se 10 mL de água ultra pura. A concentração final de ácido nítrico foi de 0,75% (v/v). Os estudos envolvendo este modificador foram realizados com a co-injeção de 15 µL da solução modificadora acompanhada da amostra.

3.4.5.2.2 MODIFICADOR DE FOSFATO DE AMÔNIO

A solução estoque de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Suprapur Merck) $10,0 \text{ g L}^{-1}$ foi inicialmente diluída a $1,00 \text{ g L}^{-1}$ em água ultrapura. Em cada leitura foi co-injetado $5 \mu\text{L}$ de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, sendo assim adicionado $5 \mu\text{g}$ do modificador juntamente com a amostra.

3.4.5.2.3 PROGRAMA DE AQUECIMENTO DO FORNO DE GRAFITE: CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE TEMPERATURA DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO

O programa de aquecimento do forno de grafite é constituído por duas etapas de secagem, uma etapa de pirólise, uma de atomização e uma última etapa de limpeza.

Durante a otimização do programa de aquecimento, foram obtidas curvas de temperatura de pirólise e de atomização na ausência e na presença dos modificadores químicos alumínio, fosfato de amônio e paládio.

As curvas de temperatura de pirólise com e sem o uso de modificador químico foram obtidas a partir dos resultados das medidas de absorvância após injeção de $20 \mu\text{L}$ da amostra de arroz em HNO_3 $0,5 \%$ (v/v). Para isso, fixou-se a temperatura de atomização em $1500 \text{ }^\circ\text{C}$, recomendada pelo fabricante do equipamento, e variou-se a temperatura de pirólise com incrementos de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ a partir de $300 \text{ }^\circ\text{C}$ até a diminuição do sinal. A Tabela 3.2 apresenta o programa de temperatura utilizado.

Tabela 3.2: Programa de temperatura usado para determinação de cádmio; uma taxa de fluxo interno de gás de 2,0 L min⁻¹ foi utilizada em todas as fases, exceto durante a atomização, quando o fluxo de gás foi desligado.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Tempo de permanência (s)
Secagem	110	15	10
Secagem	120	10	15
Secagem	140	5	10
Pirólise	-	50	20
Atomização	-	FP*	4
Limpeza	2000	FP	5

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO ALUMÍNIO COMO MODIFICADOR QUÍMICO

A aplicação do planejamento fatorial juntamente com o emprego da espectrometria de absorção atômica com forno de grafite permite a avaliação prévia das principais variáveis que podem influenciar na determinação do analito em uma amostra.

Dessa forma, com o objetivo de investigar o desempenho do alumínio como modificador químico durante a determinação de cádmio por ET AAS, um planejamento fatorial completo de dois níveis foi realizado por meio de uma massa fixa de alumínio (3,0 mg) e alíquotas (20,0 μL) de uma solução de Cd (II) 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os fatores estudados foram: tempo, temperatura de pirólise e temperatura de atomização.

Os domínios experimentais dos fatores, expressos como valores codificados e reais, bem como os valores de absorvância integrada obtidos são mostrados na Tabela 3.3.

A significância dos efeitos relacionados às variáveis estudadas foi avaliada através da análise de variância (ANOVA) e os efeitos foram verificados utilizando-se os valores p . Os resultados da ANOVA apresentados na Tabela 3.4 podem ser apresentados como gráfico de Pareto, mostrado na Figura 3.2., onde as barras horizontais estão associadas com a intensidade do efeito. São significativos, com 99% de confiança, os efeitos que estão além da linha de referência.

Tabela 3.3: Matriz e resultados do planejamento fatorial completo (2³) para avaliação preliminar do alumínio como modificador químico.

Experimento	Temperatura Pirólise (°C)	Temperatura Atomização (°C)	Tempo de pirólise (s)	Absorvância integrada
1	-(600)	-(1600)	-(10)	0,3369
2	+(900)	-(1600)	-(10)	0,2198
3	-(600)	+(2200)	-(10)	0,2617
4	+(900)	+(2200)	-(10)	0,1818
5	-(600)	-(1600)	+(30)	0,3137
6	+(900)	-(1600)	+(30)	0,2130
7	-(600)	+(2200)	+(30)	0,1666
8	+(900)	+(2200)	+(30)	0,1256
CP	0 (750)	0 (1900)	0 (20)	0,2443
CP	0 (750)	0(1900)	0 (20)	0,2398
CP	0 (750)	0(1900)	0 (20)	0,2437

De acordo com o gráfico de Pareto obtido, foi possível perceber que os três fatores avaliados apresentaram efeito significativo na resposta analítica (absorvância integrada) a 99% de confiança. Segundo o gráfico, o fator mais significativo, ou seja, aquele que mais influencia no sinal analítico do cádmio, dentro do domínio experimental estabelecido, foi a temperatura de atomização

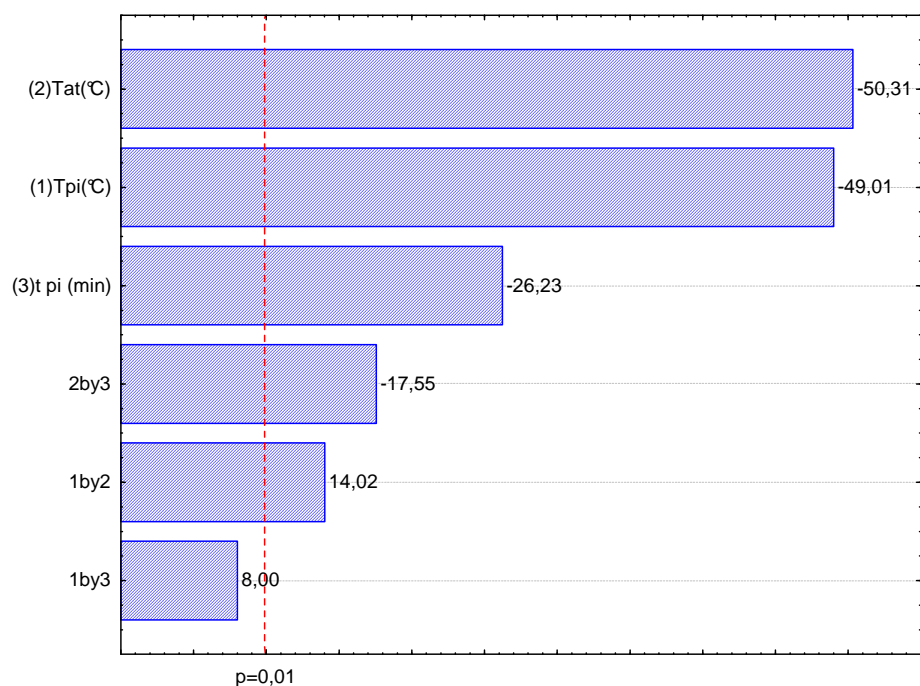


Figura 3.2: Diagrama de Pareto dos efeitos para os fatores selecionados na determinação de cádmio por ET AAS

Tabela 3.4: Tabela da ANOVA dos efeitos calculados para os dados apresentados na Tabela 3.3.

	SQ	GI	MQ	F	Valor p
T pi	0,014340	1	0,014340	2401,962	0,000416
T at	0,015112	1	0,015112	2531,308	0,000395
t pi	0,004109	1	0,004109	688,226	0,001450
(T pi) x (T at)	0,001174	1	0,001174	196,600	0,005048
(T pi) x (t pi)	0,000382	1	0,000382	64,030	0,015261
(T at) x (t pi)	0,001839	1	0,001839	308,076	0,003230
Falta de ajuste	0,000568	2	0,000284	47,588	0,020581
Erro puro	0,000012	2	0,000006		
SQ total	0,037536	10			

SQ: soma quadrática; gl: graus de liberdade; MQ: média quadrática; Valor p: nível de probabilidade; T Pi: temperatura de pirólise; T at: temperatura de atomização; t pi: temperatura de pirólise.

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória e tiveram os efeitos dos fatores calculados, como apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Valores dos efeitos calculados para os fatores estudados.

Efeito	Valor
Tempo de pirólise	- 0,0453 ± 0,00743
Temperatura de pirólise	- 0,0847 ± 0,00743
Temperatura de atomização	- 0,0869 ± 0,00743

Estes valores demonstram que todos os três efeitos são negativos, ou seja, aumentando os valores destes fatores diminui-se a resposta analítica (absorvância integrada).

Além disso, observa-se dois efeitos de interação significativos. A Figura 3.3 descreve a interação da temperatura de atomização versus o tempo de pirólise, onde se confirma que ambas as variáveis, em um menor nível, fornecem uma melhor resposta ao sistema. A falta de paralelismo entre as linhas fornece a indicação de que realmente há um efeito de interação e que este efeito é mais pronunciado à medida que o sistema se aproxima dos níveis mais altos de cada uma dessas duas variáveis. No entanto, este efeito pode ser desprezado, já que o sistema indica que ambas as variáveis fornecem melhor resposta analítica quando são utilizadas em seu menor nível.

A Figura 3.4 descreve um comportamento oposto ao visto anteriormente e justifica o porquê do efeito ter sido positivo, embora as variáveis tenham efeito negativo: o paralelismo é menor à medida que ambas as variáveis são usadas em seu nível mais elevado. Esse efeito também pode ser desconsiderado, uma vez que o gráfico indica que níveis menores oferecem melhores respostas analíticas.

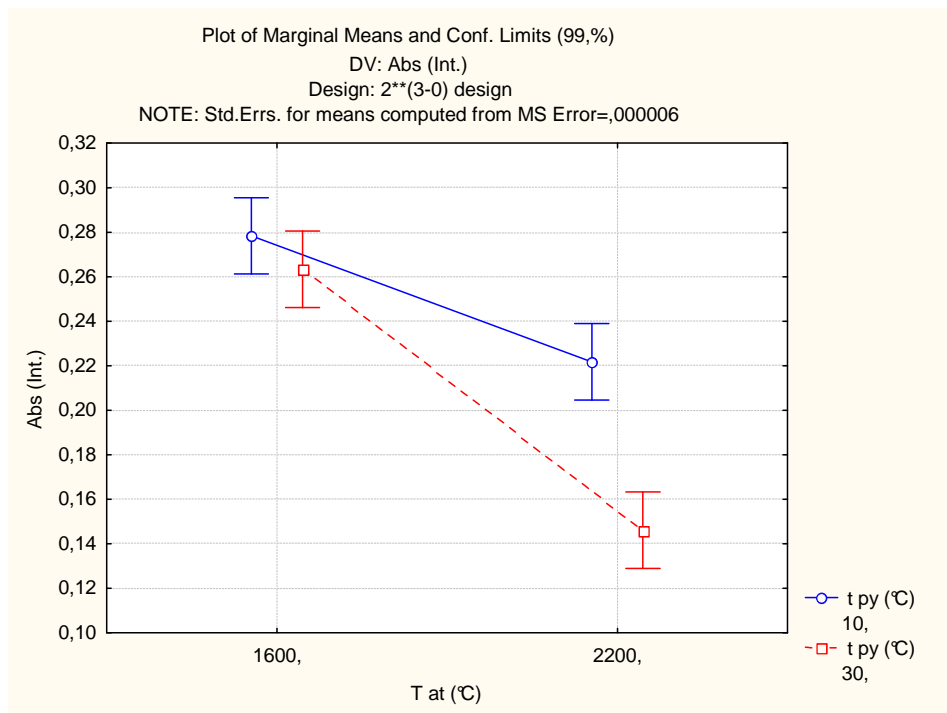


Figura 3.3: Gráfico de médias marginais para o a interação temperatura de atomização versus o tempo de pirólise.

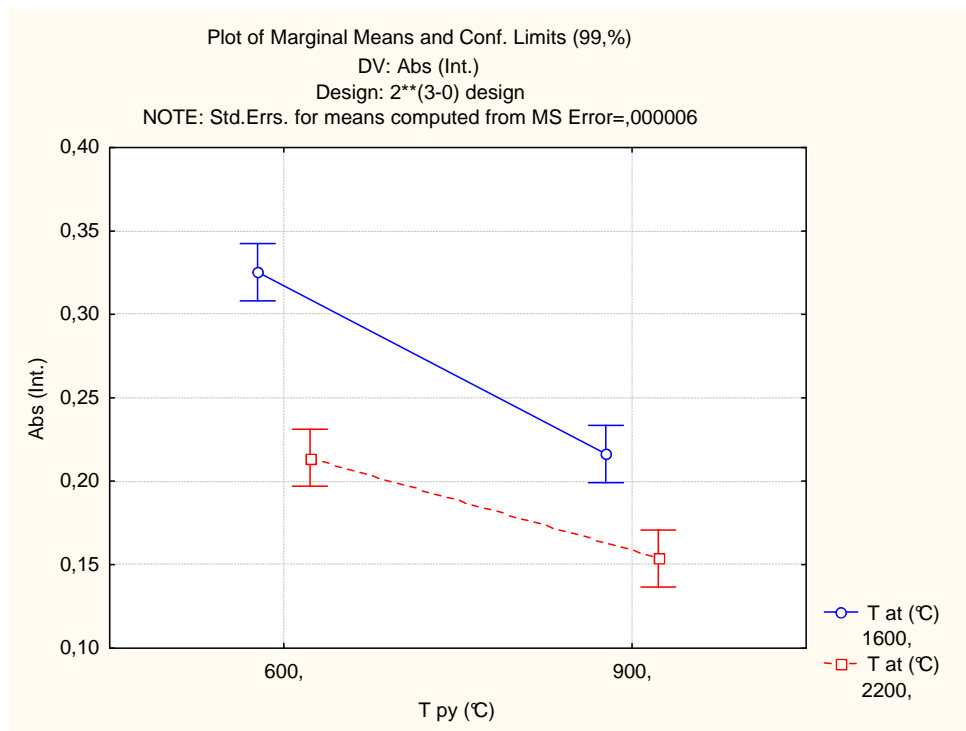


Figura 3.4: Gráfico de médias marginais para o a interação temperatura de atomização versus temperatura de pirólise.

A Tabela 3.3 mostra que o sinal analítico mais elevado (absorvância integrada de 0,3369) foi obtido com uma temperatura de pirólise de 600 °C, temperatura de atomização de 1600 °C e tempo de pirólise de 10 s. Essas condições foram próximas dos valores recomendados para a determinação de cádmio por ET AAS [113]. Além disso, estes resultados confirmam o bom desempenho do alumínio como modificador químico para a determinação de cádmio.

A equação que descreve o modelo utilizado em termos de valores codificados é apresentada na Equação 3.1.

(Equação 3.1):

$$\text{Abs} = 0,2315 - 0,0423(T_{\text{pi}}) - 0,0435(T_{\text{at}}) - 0,0227(t_{\text{pi}}) + 0,0121(T_{\text{pi}})(T_{\text{at}}) + 0,0069(T_{\text{pi}})(t_{\text{pi}}) - 0,0152(T_{\text{at}})(t_{\text{pi}})$$

3.5.2 PREPARO DO ALUMÍNIO COMO MODIFICADOR PERMANENTE

Considerando os bons resultados obtidos com o alumínio no papel de modificador químico convencional para o cádmio, tentativas foram feitas para produzir um modificador permanente.

A modificação permanente no tubo de grafite gera um ambiente mais seletivo, além de propiciar uma purificação *in situ* do modificador, resultando em baixos sinais do branco. Além disso, apresenta muitas vantagens, quer pelo aumento da vida útil do tubo, ou pela sua estabilidade operacional. Estes pontos positivos maximizam a sensibilidade na determinação para diversos elementos. Além disso, uma melhora na precisão dos dados é obtida e também uma eliminação das impurezas voláteis presentes nos modificadores [114].

Foram avaliadas deposições de 100, 200, 300, 400 e 500 µg de alumínio, realizadas, respectivamente, através de 5, 10, 15, 20 e 25 ciclos do programa de temperatura do forno recomendado pelo fabricante do equipamento conforme mostrado na Tabela 3.1. A temperatura de pirólise foi alterada para 600 °C e

eliminou-se o passo de limpeza, sendo que, a cada ciclo, 20 μg de alumínio foram depositados.

O teste foi realizado com tubos de grafite já usados, mas ainda em bom estado, tomando-se o cuidado de remover os resíduos da deposição anterior, uma vez que o excesso de alumínio sobre o tubo poderia diminuir a absorvância do cádmio. Para a remoção dos resíduos de alumínio, executou-se passos de limpeza do tubo de grafite a 2400 °C.

A avaliação da eficiência da massa depositada baseou-se no aspecto do sinal analítico de uma solução padrão de cádmio 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, bem como na maior intensidade de absorção com correção de fundo. Para isso, fixou-se a temperatura de pirólise em 600 °C e temperatura de atomização em 1500 °C, conforme recomenda o fabricante.

Como mostra a Figura 3.5, adições de 400 μg foram melhor sucedidas em relação às outras massas depositadas. Quando adicionadas massas inferiores a 400 μg de alumínio observou-se perdas de analito na temperatura de pirólise trabalhada (600 °C). Isto demonstra a existência de algum efeito da massa do alumínio sobre a volatilidade do cádmio.

Ao fazer uso de 500 μg de alumínio, a precisão dos sinais analíticos foi afetada negativamente. Isso pode ter ocorrido devido ao excesso de alumínio no tubo de grafite, impedindo assim a volatilização do analito. Dessa forma a massa de 400 μg foi suficiente para estabilização térmica do cádmio.

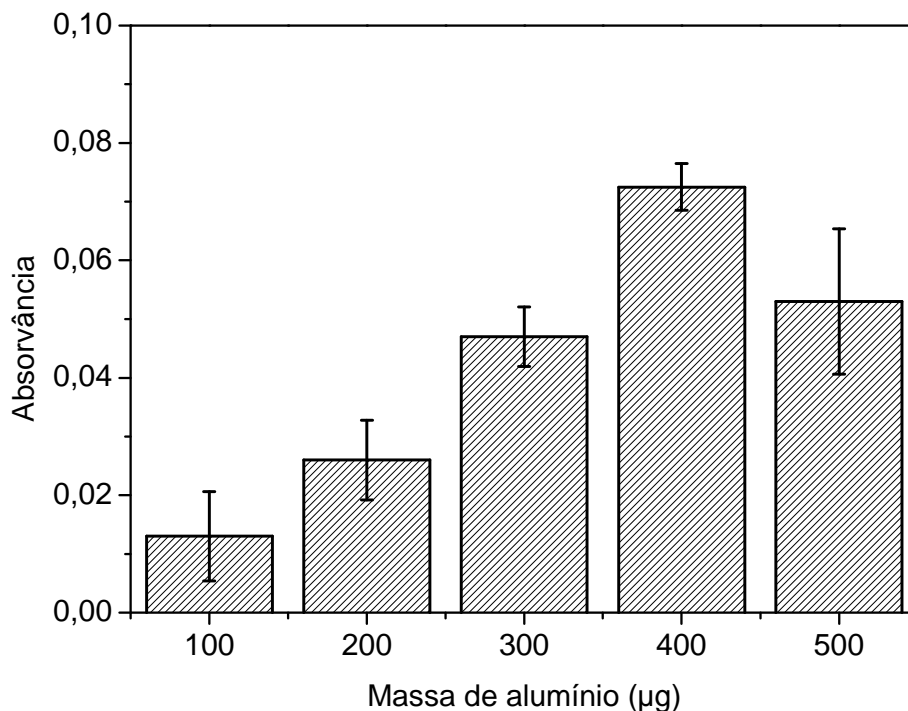


Figura 3.5: Efeito de crescentes massas de alumínio depositadas no tubo de grafite sobre a absorvância integrada.

Ao que se refere à preparação de modificadores permanentes por deposição térmica no tubo de grafite, uma recomendação que fornece a literatura [115] é a adição de massas limitadas do modificador, normalmente não de uma só vez, mas em etapas.

Dessa forma, é desejável que a massa ótima empregada para a deposição, seja a ideal para produzir o efeito apropriado de modificação química duradoura, sem alterar significativamente propriedades físicas do atomizador de grafite original, por exemplo, a condutividade ou a resistência elétrica do material. A alteração dessas propriedades físicas poderia ser prejudicial, diminuindo a absorvância obtida, o que não ocorreu ao se fazer uso de uma massa de 400 µg de alumínio.

Os testes efetuados demonstraram que, para a determinação de cádmio, é possível reaproveitar tubos de grafite já desgastados, fazendo-se prévia deposição de 400 µg de alumínio. No entanto, a duração desses tubos de grafite “reutilizados”

é bastante variável: depende do estado do tubo usado, antes da deposição dos 400 µg de alumínio e também da composição das amostras analisadas, em termos de acidez e concomitantes presentes.

Assim, os tubos reutilizados podem ser empregados desde que soluções de referência sejam periodicamente verificadas. Utilizando solução de cádmio em HNO₃ 0,5% (v/v) sem outros concomitantes, o modificador produzido com 400 µg de alumínio, previamente adicionado sobre o tubo, teve uma duração de cerca de 360 ciclos, considerando os programas de tempo e temperatura utilizados neste trabalho.

Diante dos experimentos realizados, conclui-se que a adição de alumínio produz excelentes resultados, levando-se em conta os seguintes aspectos: i) estabilização térmica até 600 °C (mesmo em tubos de grafite desgastados); ii) sinal analítico bem formado e baixo sinal de fundo; iii) simplicidade no procedimento de adição do modificador; iv) fácil preparo da solução de alumínio; v) não causa corrosão acelerada do tubo de grafite; vi) apresenta custo comparativamente menor, quando comparado a sais p.a. de metais nobres.

3.5.3 ESTUDO DO COMPORTAMENTO ELETROTÉRMICO: CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE TEMPERATURA DE PIRÓLISE E ATOMIZAÇÃO

O estabelecimento das curvas de pirólise e de atomização é uma das técnicas mais simples e amplamente empregadas pelos usuários de GF AAS para a otimização do programa de temperatura do forno de grafite.

Esta técnica consiste em representar, graficamente, a variação da absorvância integrada, com o aumento da temperatura, durante as etapas de pirólise e atomização. Isto permite, verificar a temperatura máxima permitida na etapa de pirólise para a qual não ocorrem perdas de analito, bem como a temperatura na qual a nuvem atômica atinge sua densidade máxima, ou seja, onde o sinal analítico é mais intenso, sendo também possível, verificar a absorção de fundo durante estas etapas, e adotar as condições nas quais se atinja um máximo de sensibilidade, com o mínimo de interferência possível.

No presente trabalho a comparação entre o comportamento do alumínio como modificador químico frente ao uso do fosfato de amônio e paládio, foi realizada em termos das temperaturas de pirólise e atomização e dos perfis de absorvância. Para isso, foram construídas curvas de pirólise e atomização na presença de 20 µL de uma amostra de arroz digerida com ácido nítrico (Item 3.4.4.1). Curvas de temperatura de pirólise e atomização foram também realizadas na ausência de modificador químico.

3.5.3.1 AUSÊNCIA DE MODIFICADOR QUÍMICO

Para avaliar o ganho de estabilidade térmica frente ao uso do alumínio como modificador químico, foram construídas curvas de temperatura de pirólise e atomização para o cádmio na ausência de modificador químico (Figura 3.6).

Sob essa condição, nota-se que durante a etapa de pirólise com atomização fixa em 1500 °C, o sinal analítico manteve-se constante até cerca de 500 °C, embora a absorção de fundo tenha sido muito significativa.

Durante a etapa de atomização, com pirólise fixa em 400 °C, o sinal analítico surge a partir de temperaturas superiores a 1500 °C. No entanto, o melhor perfil só é observado na temperatura de atomização de 1800 °C, ainda que haja sinal de fundo. Em temperaturas de atomização superiores a 1900 °C, embora o sinal analítico se mantenha constante, o sinal de fundo é bem superior àquele observado em 1800 °C.

Diante destes resultados, verificou-se que não é conveniente a determinação de cádmio em amostras de arroz na ausência de um modificador químico visto que a atomização deste elemento em superfícies de grafite é potencialmente impedida por interações com a superfície diminuindo o sinal analítico. Desse modo, os resultados obtidos evidenciam que uma competição pelos sítios de carbono livres na superfície do forno pode possibilitar uma melhora na atomização.

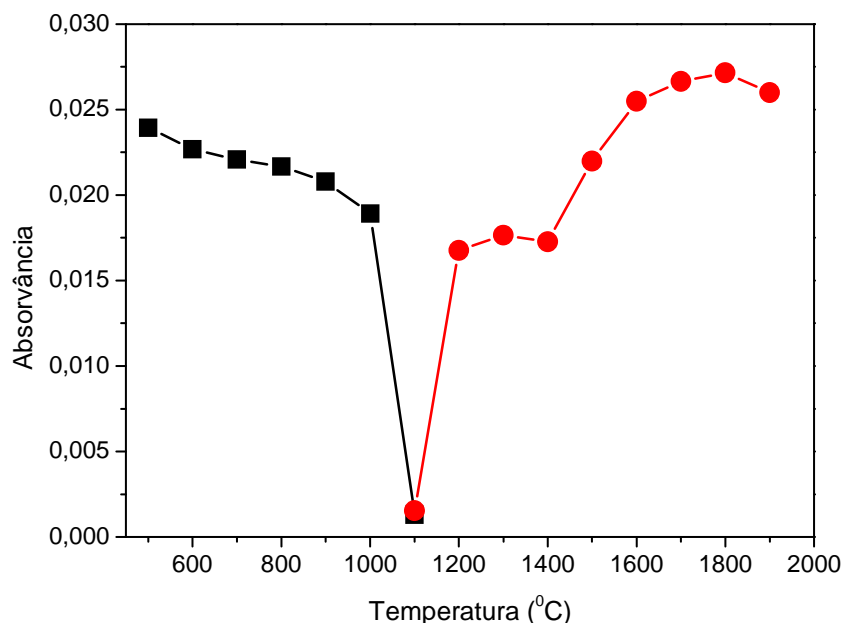


Figura 3.6: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1500 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 400 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para cádmio em $20 \text{ } \mu\text{L}$ de amostra de arroz digerida em HNO_3 sem a presença de modificador químico.

3.5.3.2 EMPREGO DO ALUMÍNIO COMO MODIFICADOR QUÍMICO

O uso do tubo modificado permanentemente com alumínio revelou que entre 300 e $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 3.7), os sinais analíticos foram essencialmente constantes. Entretanto, uma maior estabilização térmica do analito ocorreu em $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$ devido a diminuição do sinal de absorvância do fundo.

Para a otimização da temperatura de atomização, a temperatura de pirólise foi fixada em $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A Figura 3.7 mostra que o sinal analítico manteve-se praticamente constante entre 1700 e $1900 \text{ }^{\circ}\text{C}$, contudo, a temperatura de atomização escolhida foi de $1800 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pois produziu um sinal de absorção de cádmio com um bom formato e baixo sinal de fundo, como ilustra a Figura 3.8. Na temperatura de $1900 \text{ }^{\circ}\text{C}$ verificou-se que o sinal de fundo sofre aumento. Isto pode ser atribuído a vaporização de espécies moleculares da matriz a partir desta temperatura. Ainda assim, o sinal de

fundo é menor em relação ao obtido quando empregado paládio como modificador químico.

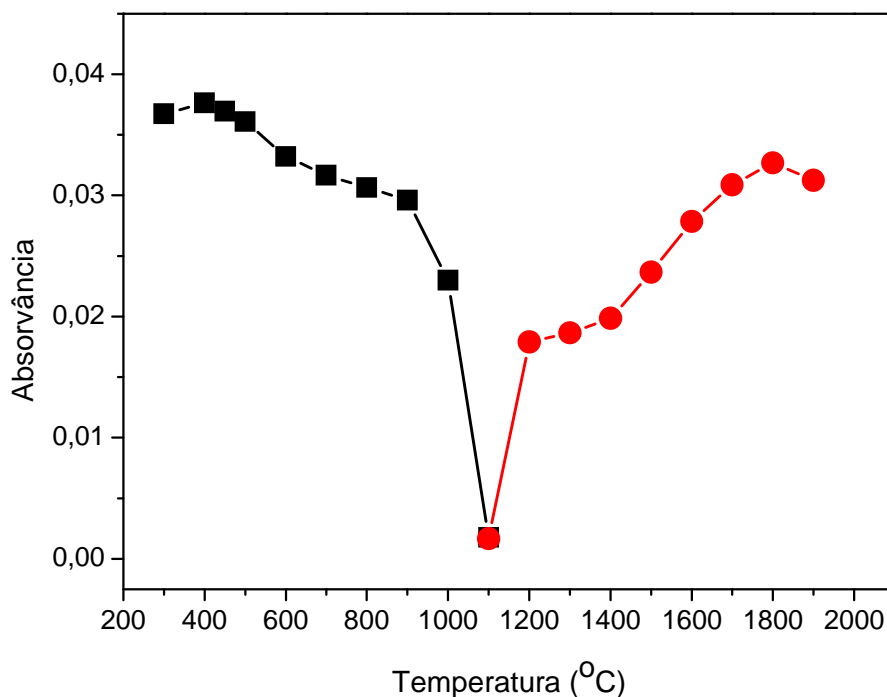


Figura 3.7: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1500 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 400 \text{ }^{\circ}\text{C}$) para cádmio em 20 μL de amostra de arroz digerida em HNO₃ utilizando o alumínio como modificador químico permanente.

Diante do exposto, pode-se afirmar que o revestimento da superfície do tubo de grafite por impregnação com alumínio, possivelmente promove uma diminuição das reações e interações do cádmio diretamente com o grafite impedindo assim a atomização antecipada desse analito.

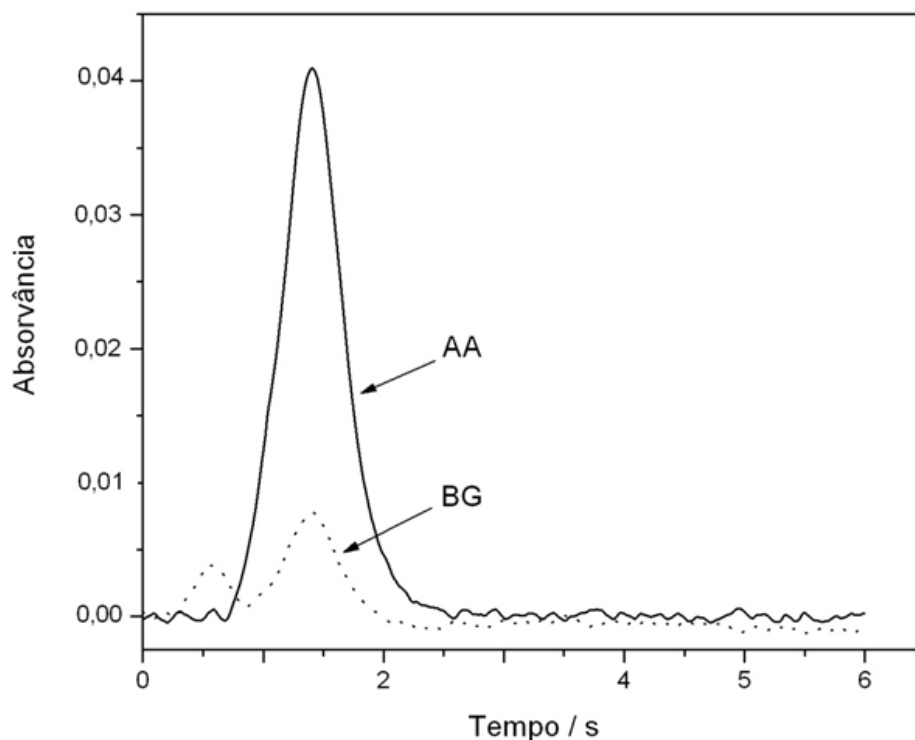


Figura 3.8: Perfil do sinal de absorção atômica (AA) e de absorção de fundo (BG) observados para a determinação de cádmio em amostra de arroz em HNO₃ 0,5% (v/v) com plataforma revestida termicamente com alumínio. Temperatura de pirólise e de atomização iguais a 400 °C e 1800 °C, respectivamente.

3.5.3.3 EMPREGO DO FOSFATO DE AMÔNIO E PALÁDIO COMO MODIFICADORES QUÍMICOS: UM ESTUDO COMPARATIVO

No sentido de avaliar a eficiência do alumínio como modificador químico, avaliou-se, para efeito de comparação, a condição de modificador químico do NH₄H₂PO₄, indicado pelo fabricante do equipamento e outra condição indicada por Rodriguez *et al.*, [116], que em seu trabalho, comparou o desempenho analítico do paládio na determinação de cádmio em mel por GF AAS.

O fosfato de amônio tem sido bastante utilizado como modificador químico nas determinações de Pb, Cd, Zn e Sn, por formar fosfatos insolúveis com o metal de interesse, fosfatos estes que, com o acréscimo da temperatura, são convertidos a

pirofosfatos, os quais são mais estáveis termicamente permitindo aumentar a temperatura de pirólise [117].

O paládio forma ligas metálicas termicamente estáveis com vários íons metálicos, o que evita a volatilização do analito antes da etapa de atomização.

Assim, foi realizada a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite para estes modificadores na presença de amostra de arroz.

O emprego do fosfato de amônio como modificador químico para a determinação de cádmio nas amostras de arroz digeridas com HNO_3 , apresentou algumas dificuldades durante a otimização das melhores temperaturas de pirólise e atomização (Figura 3.9).

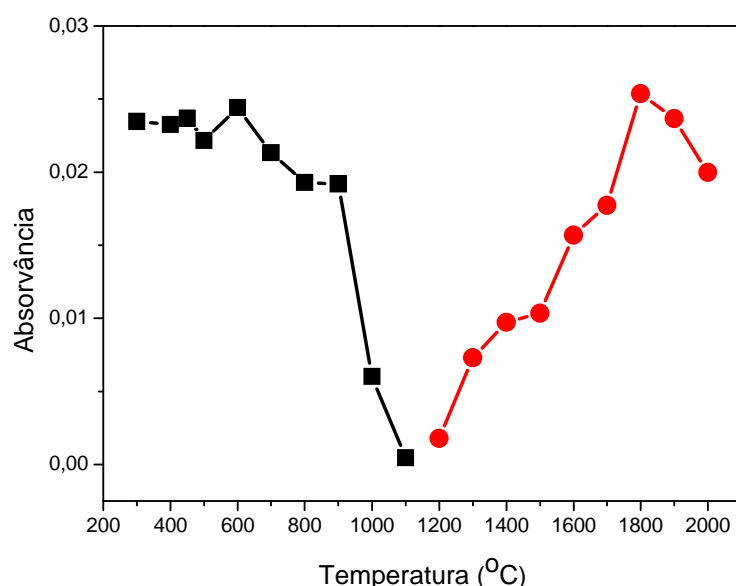


Figura 3.9: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1800 \text{ }^\circ\text{C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 600 \text{ }^\circ\text{C}$) para cádmio em 20 μL de amostra de arroz digerida em HNO_3 utilizado fosfato de amônio como modificador químico permanente.

Considerando-se a adição de 5 μg deste modificador, observou-se que a temperatura de pirólise, com atomização fixa em 1800 $^\circ\text{C}$, pode ser aumentada até 600 $^\circ\text{C}$ sem perda significativa do analito. No entanto, em toda a faixa de temperatura estudada ocorre um aumento significativo do sinal de fundo que pode

ter sido causado pela evaporação da matriz da amostra, ocasionada pelo efeito do modificador químico utilizado.

Durante a etapa de atomização, com temperatura de pirólise fixa em 600 °C observou-se que somente em temperaturas em torno de 1800 °C o sinal analítico se tornou aparente. Em temperaturas superiores a 1800 °C, observou-se um decréscimo do sinal analítico de cádmio. Este fato, provavelmente, está relacionado a problemas de compensação de sinal de fundo.

A Figura 3.10 mostra o perfil do sinal analítico do cádmio, obtido para uma amostra de arroz utilizando o fosfato com modificador químico, onde é possível observar a sobreposição do sinal de fundo em relação ao sinal de absorção do cádmio.

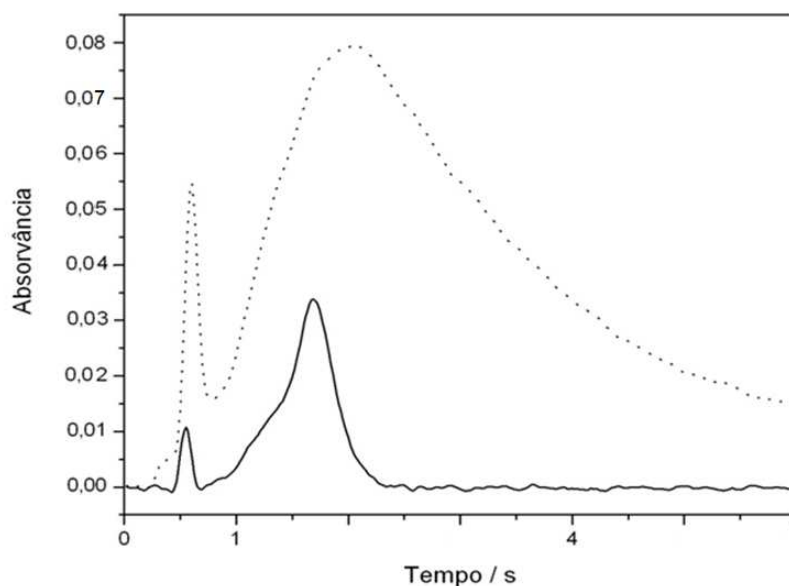


Figura 3.10: Perfil do sinal de absorção atômica e de absorção de fundo observados para a determinação de cádmio em amostra de arroz em HNO₃ 0,5% (v/v) com co-injeção de 5 µg de fosfato de amônio. Temperatura de pirólise e de atomização iguais a 600 °C e 1800 °C, respectivamente.

Outra substância empregada para estabilizar termicamente o cádmio é o paládio, na ausência e na presença de magnésio [118]. A utilização de paládio como modificador químico foi difundido quando se verificou que a mistura Pd + Mg(NO₃)₂ estabilizava termicamente 21 elementos [33].

Os sinais de absorvância obtidos com o emprego do modificador químico de paládio apresentaram uma boa estabilização térmica para o analito em amostras de arroz, podendo alcançar temperatura de pirólise de até 500 °C (Figura 3.11). A temperatura de atomização para o cádmio foi escolhida a partir do melhor perfil de absorvância e ficou em 1600 °C.

Entretanto, o uso do Pd como modificador químico não ocasionou aumento no sinal analítico do cádmio quando comparado ao alumínio, demonstrando assim menor sensibilidade, como pode ser observado nas Figura 3.12. Além disso, o uso do alumínio como modificador químico permanente permitiu a obtenção de um pico de absorção simétrico, com sinal de fundo baixo e corrigido, como mostrado na Figura 3.8.

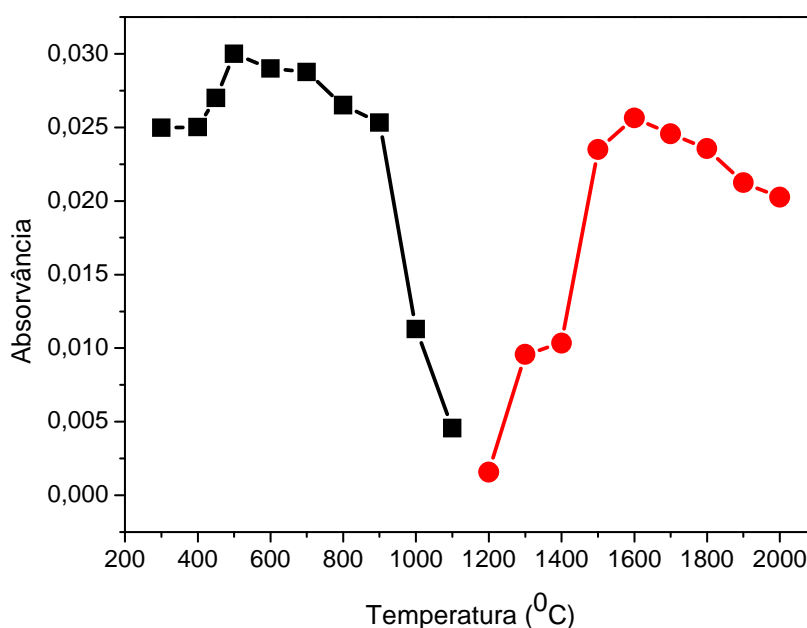


Figura 3.11: Curvas de temperatura de pirólise ($T_{\text{atomização}} = 1800 \text{ °C}$) e atomização ($T_{\text{pirólise}} = 600 \text{ °C}$) para cádmio em 20 μL de amostra de arroz digerida em HNO_3 utilizando o paládio como modificador químico permanente.

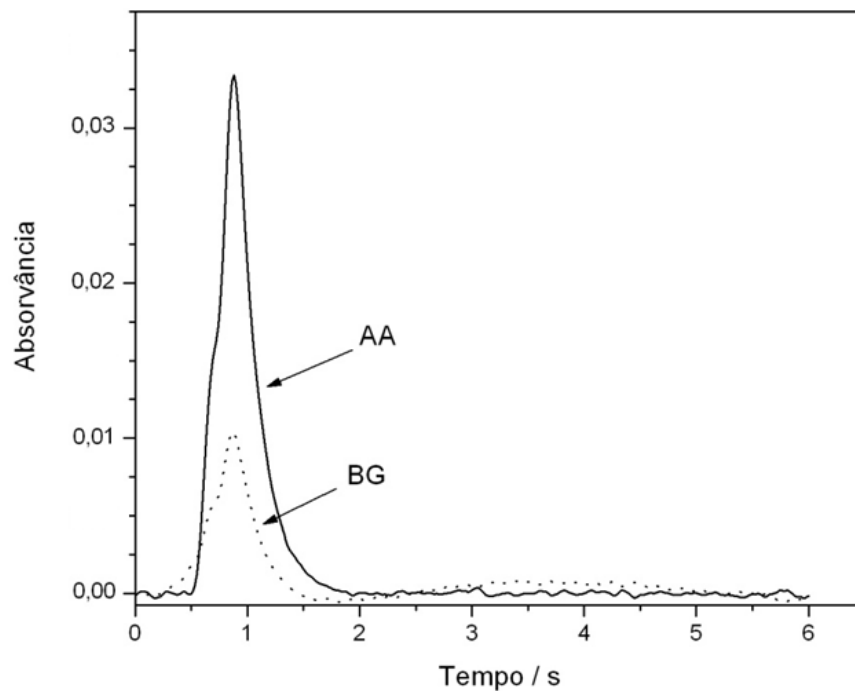


Figura 3.12: Perfil do sinal de absorção atômica e de absorção de fundo observados para a determinação de cádmio em amostra de arroz em HNO_3 0,5% (v/v) utilizando o paládio com modificador químico. Temperatura de pirólise e de atomização iguais a 500 °C e 1600 °C, respectivamente.

Diante do exposto, é possível afirmar que o alumínio apresentou maior eficiência para a determinação de cádmio em amostras de arroz quando comparado ao fosfato de amônio e ao paládio. Este fato é verificado pelos maiores sinais de absorvância obtidos no estudo das temperaturas de pirólise e atomização, demonstrando assim maior sensibilidade em relação aos outros modificadores testados, bem como na ausência de modificador, como mostra a Figura 3.13.

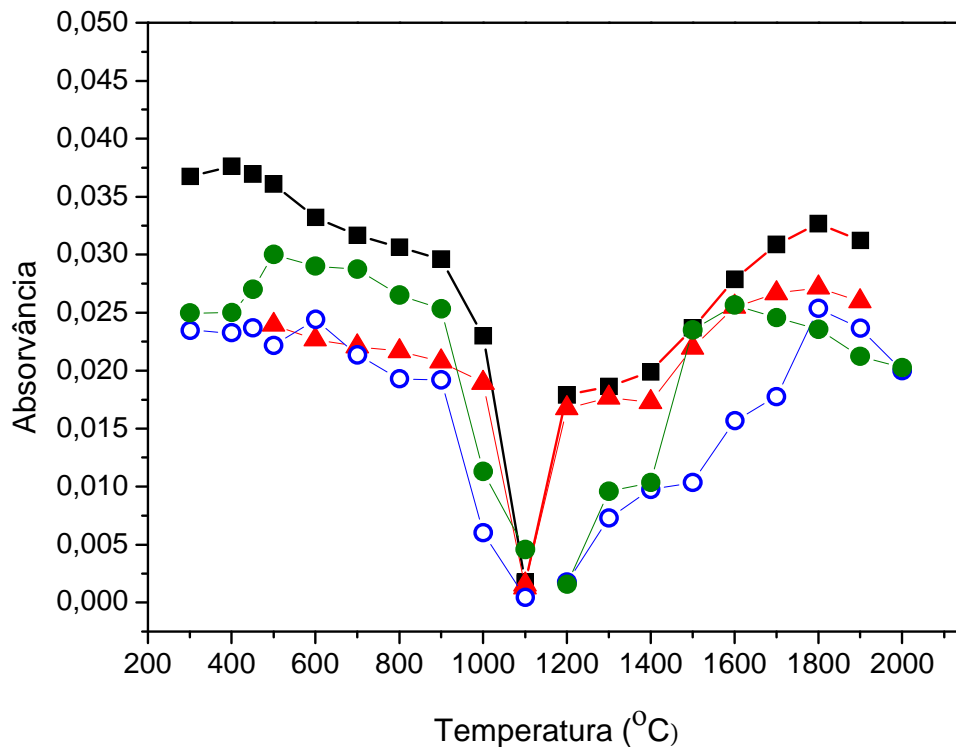


Figura 3.13: Comparação entre as curvas de temperatura de pirólise e atomização para a determinação de cádmio em amostras de arroz, submetidos a três tipos de modificadores químicos: (-■-) alumínio, (-○-) fosfato de amônio, (-●-) paládio e (-▲-) ausência de modificador químico.

3.5.4 AVALIAÇÃO DO DESGASTE DA PLATAFORMA DE GRAFITE

A reprodutibilidade do sinal analítico, bem como o perfil do pico é diretamente afetada pela condição da superfície da plataforma do tubo de grafite.

Os estudos realizados revelaram que nova deposição de alumínio seria necessária durante a utilização do tubo de grafite após 360 ciclos de aquecimento, como consequência da diminuição do sinal analítico, sendo possível a realização de até 1080 queimas utilizando o mesmo tubo.

O decréscimo do sinal analítico é ocasionado pelo desgaste na parede do tubo próximo ao orifício por onde é injetada a amostra. Esse desgaste danifica o ambiente térmico no interior do tubo de grafite, assim como promove o espalhamento da nuvem atômica, diminuindo, conseqüentemente, a sensibilidade analítica.

Segundo a literatura, o uso de modificador permanente leva a um aumento da vida útil dos tubos de grafite, o que pode ser atribuído pela resistência dos carbeto refratários formados ao ataque de muitos ácidos ou misturas destes [43,60]

Dessa forma, o tempo de vida útil do tubo de grafite utilizado, modificado permanentemente com alumínio, pode estar relacionado ao carbeto de alumínio (Al_4C_3) formado através da ligação do carbono presente no grafite e a solução de alumínio impregnada no mesmo.

Carbeto formado pelos elementos dos grupos 11, 12 e 13 da tabela periódica, incluindo também os elementos do grupo 3 juntamente com os lantanídeos e actinídeos exibem alta estabilidade térmica e alto ponto de fusão [119]. O Al_4C_3 apresenta temperatura de fusão igual a 2100 °C e temperatura de ebulição igual a 2200 °C.

Em estudo realizado por Lima *et al.*, observou-se que foi possível realizar até 350 queimas com os tubos recobertos com os modificadores permanentes W+Rh, W+Ir e W+Ru e após esse número de queimas foram feitos novos recobrimentos usando o mesmo tubo. Isso permite inferir que o revestimento com alumínio é apropriado para a determinação de cádmio em arroz, mesmo com a condição em que os tubos sofrem desgaste externo similar ao desgaste interno.

3.5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ E ESCOLHA DA TÉCNICA DE CALIBRAÇÃO

O procedimento mais simples e convencional para a determinação de metais em amostras é através da construção de curvas analíticas em meio aquoso. Entretanto, isso nem sempre é possível. A principal dificuldade encontrada está relacionada à ocorrência de interferências causadas pelos concomitantes presentes

na matriz e que não estão presentes na solução aquosa dos brancos e padrões. Assim, os processos de eliminação da matriz durante a etapa de pirólise e mecanismos de atomização podem ser diferentes.

Usando as condições experimentais otimizadas para o alumínio: modificador permanente (400 µg), tempo de pirólise (20 s), temperatura de pirólise (400 ° C) e temperatura de atomização de (1800 ° C), foram construídas duas curvas de calibração, cuja comparação permitiu avaliar o efeito de matriz (Figura 3.14). A curva tracejada corresponde àquela construída em meio aquoso, enquanto a contínua corresponde àquela construída com adição de padrão à amostra.

A técnica de adição de analito foi realizada empregando-se uma amostra de arroz com baixa concentração de cádmio. Para isso, após o procedimento de digestão, adicionou-se quantidades de cádmio de forma que fossem obtidas amostras de arroz com concentração equivalente aos seguintes pontos da curva analítica 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg L⁻¹.

As inclinações das curvas analíticas obtidas (Tabela 3.6), expressas como intervalo de confiança ao nível de 95%, demonstraram que a determinação de cádmio utilizando o método proposto neste trabalho pode ser realizada usando a técnica de calibração externa usando padrões aquosos, já que não houve diferença significativa entre as inclinações das curvas analíticas obtidas. Vale resaltar que mesmo com as curvas aparentando inclinações semelhantes, aplicou-se o teste t de Student para confirmar essa possibilidade.

Tabela 3.6: Inclinação das curvas analíticas (L µg⁻¹ ± s)

Técnica analítica	Inclinação
Calibração externa	0,036644 ± 0,001204
Adição do analito	0,035076 ± 0,004958

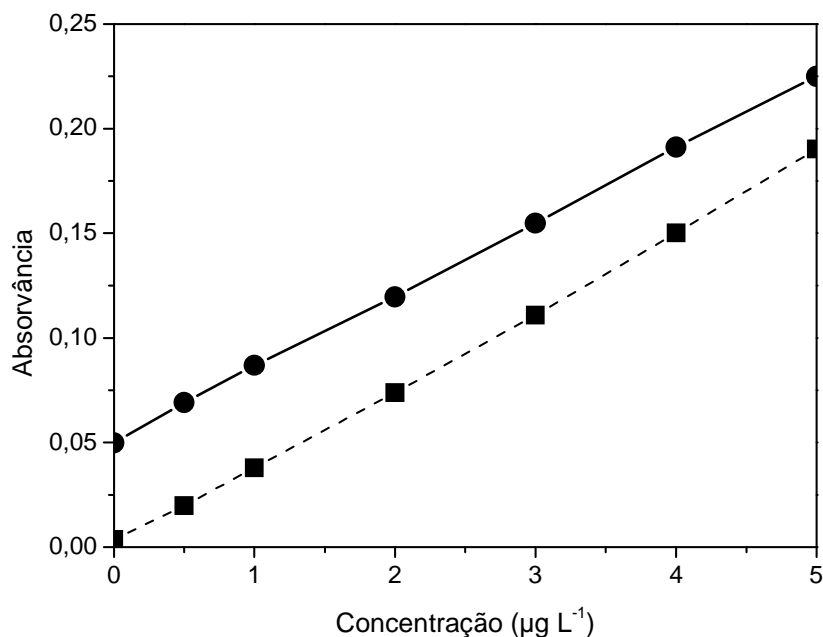


Figura 3.14: Curvas analíticas de calibração para determinação de cádmio em amostras de arroz na presença de alumínio como modificador permanente: (-■-) Solução aquosa (calibração externa) e (-●-) Adição do analito.

3.5.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Ao se propor uma nova metodologia analítica, é de fundamental importância a definição de alguns parâmetros que garantam a obtenção de dados reprodutíveis e confiáveis para a aplicação da mesma. Assim, a validação de um método é um processo pelo qual se estabelece as características do método, conferindo-lhe os requisitos de qualidade necessários para as aplicações analíticas a serem praticadas. Nesse processo, atributos ou figuras de mérito são determinados e avaliados, sendo estes importantes partes de um programa de garantia de qualidade, tendo como objetivo principal assegurar que um método seja adequado aos fins para os quais tenha sido planejado [120].

A linearidade do método proposto foi avaliada mediante a análise de soluções de diferentes concentrações, abrangendo a faixa de concentração de interesse no

trabalho, sendo para isso utilizados padrões de medida em cinco níveis distintos de concentração como recomenda a literatura [121,122]. Este parâmetro permitiu adquirir uma estimativa da qualidade da curva obtida, visto que quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Segundo a ANVISA [77] o mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (R) deve ser de 0,99.

Diante do exposto, pode-se afirmar que o método apresentou linearidade satisfatória, visto que ambas as curvas de calibração apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99 para a faixa estudada (0 a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Neste trabalho, o limite de detecção ($3\delta/s$), onde “ δ ” representa o desvio padrão da solução do branco, e “s” a inclinação da curva analítica [123], foi de 0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que para a determinação de cádmio na amostra usando aproximadamente 0,5 g de arroz este limite é equivalente a 1,8 ng g^{-1} . Para o cálculo do limite de quantificação ($10\delta/s$) também foram levados em consideração os parâmetros da curva analítica e medidas do branco. Dessa forma, o limite de quantificação deste trabalho foi equivalente a 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo que para a determinação de cádmio utilizando aproximadamente 0,5 g de amostra de arroz este limite é equivalente a 6 ng g^{-1} , considerando os mesmos valores de “b” e “ δ ” usados para calcular o LD.

Assim, pode-se afirmar que foram encontrados limites de detecção e quantificação adequados para determinações por GF AAS e compatíveis com outras metodologias encontradas na literatura. Pereira *et al.*, [124] relataram um método para determinação de cádmio em amostras de águas potáveis utilizando o Rh como modificador químico em uma temperatura de pirólise e atomização de 400 e 1100°C, respectivamente, obtendo limite de detecção de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Em outro trabalho proposto por Pereira *et al.*, [125] foi realizado um procedimento para a determinação de cádmio, cromo e chumbo em suspensão de sedimentos marinhos. Para o cádmio, o melhor modificador permanente foi o irídio apresentando temperaturas de pirólise e atomização de 400 e 1300 °C, respectivamente, e LD de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já Bobrowskagrzesik e Jakobik-Kolon [126] analisando frutas secas e ervas, conseguiram LD igual a 0,034 $\mu\text{g L}^{-1}$ em um método empregado para determinação de cádmio. Em outro estudo [127], cádmio e chumbo foram determinados em amostras de sedimentos e solos. Com as combinações de Mo-Ir e Mo-Ru foram

obtidos melhores temperaturas de pirólise para o cádmio (700 °C) e o limite de detecção obtido foi igual a 0,01 µg g⁻¹ para ambas combinações.

Assim, o limite de detecção encontrado neste trabalho, a partir dos brancos dos reagentes submetidos ao mesmo procedimento que as amostras, demonstrou que o método apresenta-se bastante sensível para a determinação de cádmio nas soluções de digeridos de amostras de arroz.

A sensibilidade do método proposto foi avaliada por se tratar de um parâmetro que demonstra a capacidade do mesmo em discriminar pequenas variações na concentração do analito. Nos métodos que utilizam a técnica de GF AAS, a sensibilidade pode ser indicada pelos valores obtidos para a massa característica (m_o). Essa grandeza corresponde a uma quantidade em massa do analito que apresenta uma absorvância integrada de 0,0044s (1% de absorção). Devido à alta sensibilidade da técnica, a unidade usada para expressar a massa característica é picograma (10⁻¹² g) [128]. Diferentemente de outras técnicas, em que a sensibilidade é calculada a partir da inclinação da curva de calibração, a massa característica pode ser determinada a partir da medida de uma amostra qualquer e comparada a um valor recomendado, sendo calculada pela equação 3.2:

(Equação 3.2)

$$m_o = \frac{v \times c \times 0,0044}{abs}$$

onde V é o volume em µL da amostra, c é a concentração em µg L⁻¹ e abs é a absorvância medida.

A massa característica determinada para um volume de 20 µL de amostra injetada no tubo de grafite foi igual a 1,32 pg. Este valor está próximo ao recomendado pelo fabricante do equipamento. Além disso, o valor encontrado para a massa característica, bem como para o limite de detecção são comparáveis com os obtidos para a determinação de cádmio utilizando outros modificadores, como pode ser visto na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Características analíticas para a determinação de cádmio por ET AAS empregando diferentes modificadores permanentes.

Modificador	Pirólise (°C)	Massa característica (pg)	Limite de Detecção (ng g⁻¹)	Referência
Ausência	400	2,5	3	Este trabalho
Alumínio	400	1,3	2	Este trabalho
Molibdênio	600	1,5	30	131
Írídio	600	1,3	20	131
Rutênio	600	1,3	20	131
Molibdênio-íridio	700	1,1	10	131
Molibdênio-rutênio	700	1,1	10	131
Paládio-magnésio	800	2,1	50	131
Vanádio	550	1,3	11	129
Írídio	600	1,2	7	133
Vanádio-íridio	650	1,0	3	133
Vanádio-rutênio	650	1,0	4	133
Tungstênio-vanádio	650	1,0	4	133
Tungstênio-íridio	700	0,9	0,6	130
Paládio	600	1,0	0,5	131
Nióbio-íridio	700	0,79	-	90
Paládio-magnésio	700	1,6	0,82	132
Paládio-magnésio	800	1,0	0,7	136

^a combinado com NH₄H₂PO₄

A precisão do método, expressa em termos de desvio padrão relativo (%RSD), calculado a partir de uma série de medições sucessivas da amostra (n=7) sob condições de repetitividade, foi de 1,67% para amostra de arroz com concentração de cádmio de 41,3 ng g⁻¹.

Neste trabalho, a exatidão do método foi avaliada através da análise de material de referência certificado de farinha de arroz NBS SRM 1568a. Aplicando o método proposto foi encontrada uma concentração de cádmio concordante com o valor certificado (Tabela 3.8). O CRM foi preparado do mesmo modo como os digeridos de arroz.

Para avaliar se houve diferença significativa, a um nível de confiança de 95%, entre o valor certificado e o valor encontrado, foi aplicado o teste t, que permitiu inferir que não houve diferença significativa entre os valores obtidos pelo método proposto e o valor certificado, conferindo assim exatidão ao método proposto.

Tabela 3.8: Determinação de cádmio em material certificado (n=3).

Material de referência	Concentração de mercúrio	
	Valor certificado	Valor encontrado
NIST 1568a	1,82 ± 0,06 µg g ⁻¹	1,78 ± 0,03 µg g ⁻¹

O método desenvolvido neste trabalho apresentou uma faixa linear que se estendeu de 0,30 a 5,0 µg L⁻¹. Essa faixa de concentração, na qual a sensibilidade pode ser considerada constante, corresponde a 6,0 e 100,0 ng g⁻¹ para as amostras de arroz digeridas. A faixa linear consiste na extensão da aplicabilidade do método, e vai desde o limite de quantificação (LQ) até a concentração onde se observa o desvio da linearidade.

Diante do exposto, o desenvolvimento do método para determinação de cádmio em amostras de arroz por ET AAS empregando alumínio como modificador químico permanente, apresentou boa precisão e exatidão, baixo limite de detecção e quantificação, além de massa característica concordante com a estabelecida pela

literatura. Na Tabela 3.9 são apresentadas as principais figuras de mérito obtido para o método proposto.

Tabela 3.9: Parâmetros analíticos obtidos para o procedimento de determinação de cádmio em amostras de arroz.

Parâmetro	Valor
R^2 (n = 3)	0,9992
Faixa linear	0,30 – 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
	6,0 – 100,0 ng g^{-1}
Limite de detecção	0,09 $\mu\text{g L}^{-1}$
	1,8 ng g^{-1}
Limite de quantificação	0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$
	6 ng g^{-1}
Massa característica	1,32 μg
Precisão (n = 7) ^a	1,67%

^a Valor calculado a partir de uma amostra de cádmio com concentração igual a 41,3 ng g^{-1} .

3.5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

3.5.7.1 DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM AMOSTRAS DE ARROZ

Na Tabela 3.10 estão apresentados os teores de cádmio determinados em amostras de arroz adquiridas em supermercados na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, em março de 2011. Pode-se observar que a faixa de concentração de cádmio nessas amostras foi de 11,6 a 43,0 ng g⁻¹ para uma média de 30,1 ng g⁻¹. Todos os resultados obtidos apresentaram-se abaixo do limite de quantificação.

A contaminação das amostras de arroz por cádmio pode ser advinda de várias fontes dentre elas, a deposição atmosférica, aplicação de fertilizantes, corretivos, agrotóxicos, água de irrigação, resíduos orgânicos e inorgânica ou intrínseca ao próprio processo de beneficiamento do grão.

Os resultados mostraram que as amostras de arroz identificadas como 02 e 31 apresentaram maior teor de cádmio. Ainda assim, essas concentrações encontradas não fornecem risco à saúde dos consumidores.

Segundo a Organização Mundial da Saúde o limite tolerável para ingestão de cádmio é de 7,0 µg/ kg de peso corpóreo / semana, aplicável tanto para adultos como para bebês e crianças [81]. Considerando uma criança com um peso corpóreo de 10 Kg, seria necessária a ingestão de 1,56 Kg/semana do arroz da marca 02 para que o mesmo oferecesse risco a saúde por ingestão de cádmio.

Além disso, os teores de cádmio nas amostras de arroz analisadas apresentaram-se inferiores ao limite máximo de tolerância deste metal permitido em alimentos pela ANVISA (1,0 µg g⁻¹).

Tabela 3.10: Concentração de cádmio em amostras de arroz cru adquiridas em supermercados da cidade de Salvador-Ba.^{a,b}

Amostra	Tipo de arroz	[Cd] ng g ⁻¹	Amostra	Tipo de arroz	[Cd] ng g ⁻¹
01	PW	33,3 ± 1,9	18	PW	26,6 ± 0,3
02	W	44,9 ± 1,5	19	PW	19,3 ± 0,2
03	PW	33,4 ± 1,9	20	W	34,2 ± 1,3
04	PB	28,6 ± 1,3	21	W	33,1 ± 0,4
05	W	38,3 ± 1,0	22	PW	27,7 ± 0,9
06	PW	33,4 ± 0,6	23	PW	26,3 ± 1,2
07	W	39,2 ± 1,5	24	W	38,4 ± 2,0
08	PW	41,3 ± 0,1	25	W	38,0 ± 0,9
09	PW	17,2 ± 1,6	26	PB	17,0 ± 0,4
10	PB	22,1 ± 1,3	27	PW	22,4 ± 1,1

Continuação da *Tabela 3.10*: Concentração de cádmio em amostras de arroz cru adquiridas em supermercados da cidade de Salvador-Ba.

11	PW	11,6 ± 1,5	28	W	29,0 ± 1,1
12	W	26,0 ± 1,1	29	W	33,9 ± 1,5
13	PB	22,1 ± 0,2	30	W	39,2 ± 1,5
14	PW	35,0 ± 0,3	31	W	43,0 ± 1,4
15	PW	34,4 ± 0,3	32	W	39,3 ± 2,5
16	PB	25,0 ± 0,2	33	PB	18,3 ± 1,0
17	PB	28,4 ± 0,3	34	PW	24,2 ± 1,4

^a Resultados expressos com intervalo de confiança de 95%. ^b W: arroz branco; PW: arroz branco parboilizado; PB: arroz integral parboilizado

3.5.7.2 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE CÁDMIO APÓS LAVAGEM E COCÇÃO

Neste estudo avaliou-se o teor de cádmio em amostras de arroz cozido e cru que passaram pelo processo de lavagem. Utilizou-se água ultrapura para os procedimentos de lavagem e cocção para que não houvesse interferência na concentração do analito determinado.

No primeiro teste, massas de 0,5 g de amostras de arroz cru, inicialmente lavadas com água ultrapura, foram analisadas. Posteriormente, um outro estudo foi realizado onde essas amostras lavadas foram também cozidas utilizando-se 20 mL de água ultrapura em forno micro-ondas por 12 minutos, como indicado no item 3.4.4.11.

A concentração de cádmio foi determinada nos dois casos e os resultados são apresentados na Tabela 3.11. Os resultados expressos em ng g^{-1} de cádmio em arroz demonstraram uma significativa redução deste analito nas amostras de arroz analisadas. Amostras de arroz cru que foram somente lavadas apresentaram uma perda de, aproximadamente, 5% de cádmio. As amostras que, além de lavadas, foram cozidas, indicaram uma perda significativa de aproximadamente 20% de cádmio.

De acordo com Silva *et al.*, [133] a cocção em forno de micro-ondas permite alcançar temperaturas superiores à do forno convencional, o que, teoricamente, resultaria em perda mais expressiva de micronutrientes por degradação térmica. No entanto, essa redução pode ser minimizada pelo fato da cocção em micro-ondas permitir um aquecimento mais uniforme e mais rápido do alimento, quando comparado ao cozimento convencional em que a condução de calor se processa de maneira mais lenta.

Este fato sugere que as condições aplicadas para a cocção do arroz neste trabalho foi suficiente para que uma parcela do cádmio fosse removida pela água de cocção.

A partir dos resultados obtidos, é possível também afirmar que o conteúdo de cádmio presente em amostras de arroz pode ser reduzido por meio da lavagem antecipada do processo de cocção.

Neste estudo, as amostras de arroz foram coccionadas uma única vez e percebeu-se uma perda significativa no processo de remoção de cádmio nas amostras analisadas.

Cuppari *et al.*, [134] afirmam que no meio hospitalar adota-se a cocção por duas vezes nos alimentos, desprezando-se a água a cada vez. Dessa forma, a autora e colaboradores realizaram um estudo coccionando vegetais por uma única vez e também duas vezes e, verificaram que apenas uma cocção foi suficiente para retirada de minerais dos vegetais.

Sugere-se assim uma única cocção do alimento em quantidade de água adequada. Dessa forma, mantêm-se a aparência e a consistência do alimento.

Tabela 3.11: Concentração de cádmio nas amostras cozidas com e sem lavagem.

Amostra	Arroz cru	Arroz cru com lavagem	Arroz cozido com lavagem
8	41,33 ± 0,13	40,31 ± 3,01	27,93 ± 0,08
13	22,14 ± 0,20	21,25 ± 0,10	17,47 ± 0,17
14	34,96 ± 0,33	32,31 ± 0,15	28,31 ± 0,28
15	34,40 ± 0,32	32,95 ± 0,16	26,24 ± 0,26
16	24,97 ± 0,23	22,48 ± 0,11	20,60 ± 0,20
17	28,41 ± 0,27	26,62 ± 0,13	22,72 ± 0,23
18	26,59 ± 0,25	25,14 ± 0,12	21,07 ± 0,21
19	19,33 ± 0,18	18,48 ± 0,09	15,72 ± 0,16

Assim, a partir dos experimentos realizados sugere-se que sejam feitos novos estudos com condições experimentais similares e diferentes, pois existe escassez de material científico atualizado sobre este assunto. Além disso, vários fatores podem influenciar na redução de metais como o cádmio, a citar: o tempo, temperatura, recipiente, potência, frequência e os diferentes tipos de cocção.

Este estudo é de grande relevância para pacientes que apresentam diagnóstico de excesso de cádmio, bem como para profissionais que indicam em seus consultórios métodos de pré-preparo e preparo de alimentos.

3.5.8 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O uso do alumínio como modificador permanente se apresenta como uma excelente estratégia para determinação de cádmio em amostras de arroz por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Tal conclusão é baseada nos resultados obtidos nas curvas de temperatura de pirólise, atomização e dos sinais de absorvância de fundo, que revelaram boa sensibilidade, bem como a redução de sinais relativos ao fundo. Além disso, a modificação permanente permitiu a agilidade das análises, uma vez que o passo de adicionar o modificador químico para cada injeção da amostra é eliminado. O alumínio permaneceu estável por 360 queimas. Adicionalmente, os estudos demonstraram que, para a determinação de cádmio, é possível reaproveitar tubos de grafite já desgastados, fazendo-se prévia deposição de alumínio.

O método proposto mostrou boa precisão e sensibilidade. Os limites de detecção, de quantificação e a massa característica encontrados neste trabalho são compatíveis com outras metodologias encontradas na literatura. A análise de material de referência certificado foi utilizado para validar o método desenvolvido e os resultados obtidos concordaram com os valores certificados.

A determinação de cádmio por GF AAS nas amostras de arroz foi adequada, apresentando baixos desvios entre as medidas. As concentrações encontradas encontram-se abaixo do limite máximo admissível estabelecido pelo Ministério da Agricultura do Brasil.

Além disso, os experimentos realizados revelaram que amostras de arroz cru que foram preliminarmente lavadas apresentaram uma perda de cádmio. As amostras que, além de lavadas, foram cozidas, revelaram uma perda significativa do analito.

Dessa forma, conclui-se que este trabalho é oportuno, considerando a elevada toxicidade do cádmio e tendo em vista que o arroz encontra-se entre os cereais mais consumidos do mundo.

- **Uso de ferramentas quimiométricas na avaliação da composição mineral de amostras de arroz**

4.1 INTRODUÇÃO

A avaliação nutricional de alimentos consumidos na dieta humana tem sido cada vez mais frequente. A determinação de nutrientes orgânicos e inorgânicos pode revelar o potencial nutricional de alimentos, bem como contribuir para a formulação de tabelas de composição alimentar utilizadas por médicos e nutricionistas [5].

Além disso, dados a respeito da concentração de metais em alimentos vegetais são de grande relevância, uma vez que podem fornecer informações a respeito dos impactos causados por produtos químicos, efluentes e resíduos utilizados na manutenção de cultivos. Dessa forma, torna-se possível avaliar os níveis de poluição ambiental nas regiões de produção destes alimentos.

A determinação dos teores de minerais em alimentos é importante para garantir a qualidade e autenticidade dos mesmos. Diferentes técnicas analíticas podem ser empregadas para esse fim, no entanto, percebe-se que a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) tem sido a mais viável para a quantificação dos elementos minerais, por ser uma técnica multielementar e possibilitar a leitura com mínimo tratamento das amostras, reduzindo de forma considerável o tempo e o custo das análises químicas.

A avaliação dos resultados de um experimento químico envolve a análise de um grande número de variáveis, sendo que apenas algumas dessas variáveis contêm informações relevantes, enquanto a maioria das variáveis não acrescenta muito na interpretação dos dados.

Para auxiliar na interpretação dos resultados, a representação gráfica do conjunto de dados se tornou uma ferramenta importante. Para estes estudos alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos como: análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA).

O presente trabalho determinou a composição mineral de arroz integral, parboilizado e amostras de arroz branco usando ICP OES. O efeito do cozimento no

conteúdo mineral também foi investigado. Todos os dados obtidos foram avaliados utilizando as técnicas de análise multivariada PCA e HCA. Assim, as análises utilizando ICP OES aliadas à quimiometria puderam, com sucesso, detectar pequenas diferenças entre as amostras de arroz estudadas tornando possível detectar os efeitos, por exemplo, em diferentes tipos de beneficiamento do arroz, bem como avaliar as consequências resultantes das modificações em termos de composição química.

4.2 QUIMIOMETRIA

A aquisição de dados, principalmente na área de Química Analítica, atingiu um ponto bastante sofisticado com o interfaceamento de instrumentos aos computadores produzindo uma enorme quantidade de informação, muitas vezes complexa e variada [135].

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras. Há muito tempo a estatística univariada vem sendo aplicada a problemas químicos, mas a sua utilização tornou-se limitada. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade e dando origem a uma nova disciplina, batizada de Quimiometria.

A Quimiometria, do inglês “*chemometric*”, pode ser definida como a pesquisa e utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos.

Diante dos modernos instrumentos utilizados na área da Química, uma das características mais interessantes que pode-se observar é o número das variáveis que podem ser medidas em uma única amostra. De posse de tal quantidade de dados, a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratá-los e extrair informações relevantes cresceu muito rapidamente, o que deu origem à Quimiometria, uma área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada [136].

Embora a utilização corriqueira de métodos estatísticos e matemáticos na interpretação de dados experimentais seja bem anterior à década de 70, em geral, eles se restringiam a dados de pequena ordem de grandeza e faziam uso de teorias apenas rudimentares e de pouca eficiência. Apenas no final da década de 60 que os químicos vislumbraram o grande potencial dos métodos multivariados mais sofisticados na interpretação de dados, especialmente aqueles mais complexos e de grande porte produzidos pela instrumentação moderna. Os métodos quimiométricos

disponíveis atualmente possibilitam assim que estes novos e, quase sempre, caríssimos instrumentos, possam ser plenamente utilizados em análises de rotina.

Com o crescimento da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas para tratamento de dados encontrando aplicações distintas conforme o objetivo do estudo como, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados e as determinações quantitativas.

A principal linha de pesquisa da quimiometria aplicada à química analítica tem sido a construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados através de um vetor para cada amostra, sendo a construção desses modelos denominada calibração multivariada [137].

A análise multivariada é uma ferramenta bastante empregada no intuito de verificar a existência de similaridades entre as amostras que, por sua vez, correspondem às semelhanças na composição química das mesmas [84]. O número de parâmetros analisados (variáveis) nos estudos de reconhecimento de padrões é elevado e a representação gráfica de todo o conjunto de dados facilita a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Entre eles, destacam-se a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). O uso desses algoritmos tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou ausência de agrupamentos naturais entre as amostras. Ambos são classificados como exploratórios ou não supervisionados, visto que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração [84].

A primeira etapa das análises quimiométricas é a definição do problema, o qual tem por objetivo a escolha do método a ser empregado, e garantir que as informações desejadas sejam coletadas. Geralmente são empregados a análise exploratória dos dados e a classificação de amostras.

4.2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

A finalidade preliminar de técnicas de agrupamento é apresentar os dados em uma aproximação que demonstre o agrupamento em um espaço multidimensional de tal maneira que todos os objetos de um simples grupo tenham alguma relação natural entre si, e os objetos de diferentes grupos sejam diferentes de cada outro. Nessas técnicas de agrupamento, também é possível verificar a presença de amostras atípicas, ou que não seguem o mesmo padrão das demais.

Para proceder às análises exploratórias multivariadas, todos os dados obtidos sobre as amostras em questão são organizados em uma única planilha, ou seja, em uma única matriz, a qual é constituída por n amostras e i variáveis, resultando em uma matriz $n \times i$.

Com os dados organizados em uma matriz é possível fazer a visualização dos dados originais. Isso é importante uma vez que pode revelar alguma anormalidade, como uma medida problema, como, por exemplo, erro na determinação de um constituinte inorgânico ou um espectro em que o ajuste do deslocamento químico não foi bem realizado.

Os métodos estatísticos de análise também requerem amostragem em replicatas com o objetivo de aumentar a representatividade das amostras e diminuir erros que são gerados aleatoriamente [138].

Os métodos quimiométricos usados para identificar as semelhanças e diferenças em diferentes tipos de amostras, agrupá-las e classificá-las, estão divididos em dois grupos: “métodos supervisionados” e “métodos não supervisionados” de reconhecimento de padrões. Ambos se fundamentam nas seguintes suposições: amostras de mesmo tipo são semelhantes; existem diferenças entre diferentes tipos de amostras; e as semelhanças e diferenças estão refletidas nas medidas utilizadas para caracterizar as amostras.

Nos métodos supervisionados, cada amostra analisada provém de uma classe pré-estabelecida e esta informação é utilizada durante a construção dos modelos. Os métodos não supervisionados não fazem uso desta informação e, portanto, não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da classificação das

amostras. Elas são agrupadas naturalmente com base nos dados experimentais em questão.

As análises exploratórias empregando métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões podem ser realizados por agrupamento hierárquico (HCA: Hierarchical Cluster Analysis) ou por análise de componentes principais (PCA: Principal Componente Analysis) ou ambas. Ambas as técnicas são baseadas na suposição de que quanto mais semelhantes forem as amostras entre si, mas próximas essas estarão em um espaço multidimensional.

4.2.1.1 ANÁLISE DE AGRUPAMENTO POR MÉTODOS HIERÁRQUICOS (HCA)

A análise de agrupamentos por métodos hierárquicos é um método de reconhecimento de padrões usado para formar agrupamentos em um conjunto de dados, relacionando amostras ou variáveis de tal modo que os membros de cada grupo tenham atributos semelhantes. Como dito anteriormente é um método não supervisionado, isto é, que não faz uso do conhecimento *a priori* sobre a classificação ou de informações sobre a existência de agrupamentos entre as amostras ou variáveis. Este tipo de análise pode ser especialmente adequado para descobrir “padrões” de comportamento [86].

Na análise de agrupamentos por métodos hierárquicos os dados são apresentados de forma que se enfatize o agrupamento natural em espaço bidimensional, o qual pode ser obtido considerando-se as amostras ou as variáveis. A HCA calcula a distância entre as amostras, sendo que para distâncias menores as amostras são mais semelhantes. O agrupamento de amostras revela as similaridades existentes entre as mesmas, enquanto que o agrupamento das variáveis dá uma ideia da correlação entre essas [83].

Os resultados são apresentados sob a forma de uma árvore hierárquica, também conhecida como dendograma, um gráfico que representa a estrutura hierárquica dos dados onde os comprimentos dos ramos das árvores representam graus de similaridade entre os objetos. Admitindo que as amostras próximas entre si no espaço multidimensional são semelhantes em relação às variáveis consideradas definimos um índice numérico para medir a proximidade entre pares de pares, de

amostras, isto é, a distância entre elas. O passo seguinte é identificar e agrupar amostras que estão mais próximas. Depois que as amostras foram todas agrupadas, o índice de similaridade entre os grupos é calculado. Para dois grupos A e B o índice de similaridade, $AS_{A,B}$, é definido como:

$$SA_{A,B} = 1,0 - (d_{A,B}/d_{m\acute{a}x})$$

Onde $d_{A,B}$ é a distância entre os grupos que será definida logo a seguir e $d_{m\acute{a}x}$ é a distância máxima entre dois grupos do conjunto de dados. Com esta escala, ao invés da distância, normalizamos sua medida entre zero e 1,0. Isto quer dizer que quando $d_{A,B}$ é igual a $d_{m\acute{a}x}$, a similaridade entre A e B é zero. Por outro lado, quando se tem duas amostras idênticas, isto é, quando $d_{A,B} = zero$, a similaridade é 1,0.

Finalmente os resultados são representados na forma de um dendograma. Os comprimentos dos ramos variam de zero a 1,0 e correspondem ao grau de similaridade entre os grupos, isto é, dois ramos distintos da árvore se unem para obter um único grupo no valor correspondente ao índice de similaridade entre dois respectivos grupos. O dendograma resultante possibilita a visualização das distâncias entre as amostras em que pode ser observado o grau de similaridade existente, facilitando o reconhecimento de grupos em que vários métodos de conexão podem ser utilizados (Figura 1) [139].

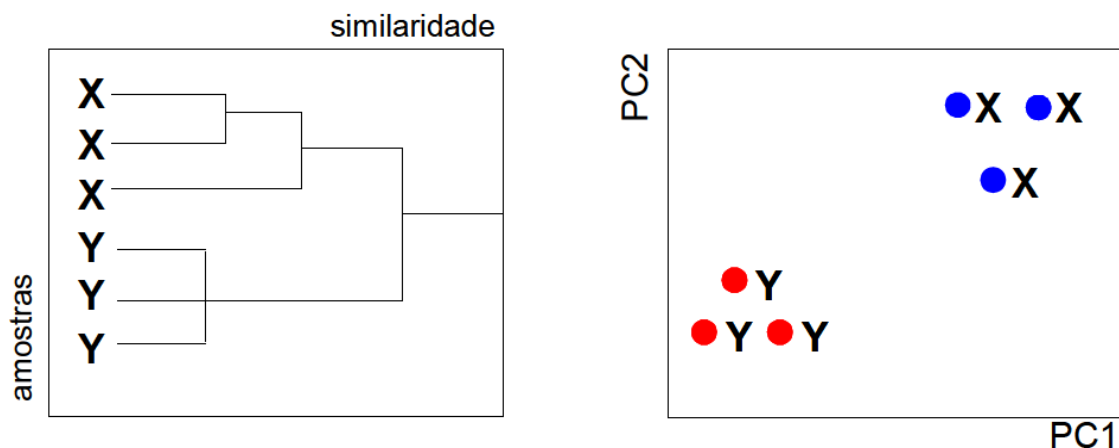


Figura 4.1: Representação das formas de visualização dos resultados de uma análise exploratória dos dados pela análise de agrupamento hierárquico (A) e análise por componentes principais (B), sendo X e Y duas categorias de amostras.

4.2.1.2 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

4.2.1.2.1 BREVE HISTÓRICO

As origens de técnicas estatísticas são difíceis de rastrear. Sabe-se, através de Preisendorfer e Mobley (1988), que Beltrami (1873) e Jordan (1874) derivaram independentemente a decomposição de valores singulares, conhecida como singular Value Decomposition (SVD) em uma forma que é base para a análise de componentes principais. Contudo, as primeiras descrições da técnica, que hoje é conhecida como PCA, foram dadas por Pearson (1901) e Hotelling (1933) [140].

Nos 32 anos entre os artigos de Pearson e Hotelling, muito pouco material relevante foi publicado. Alguns estudos nesse período se concentravam em *factor analysis* [88]. Apesar da abordagem de Hotelling partir dessas idéias, PCA é diferente em caráter de *factor analysis*.

Mesmo utilizando abordagens diferentes, Pearson e Hotelling chegaram à derivação de PCA: Pearson, na tentativa de encontrar retas e planos que melhor se ajustavam a um conjunto de pontos em um espaço p -dimensional e, mais tarde, Hotelling ao procurar um menor “conjunto fundamental de variáveis independentes” que determinassem os valores das p variáveis originais.

Hotelling nota que tais variáveis são chamadas de fatores na literatura convencional, mas introduz o conceito de componentes para evitar confusão com outros usos da palavra na matemática. Hotelling escolhe seus componentes de forma a maximizar as suas sucessivas contribuições para o total das variâncias das variáveis originais e chama os componentes que são derivados dessa forma de componentes principais.

Pouco trabalho foi feito no desenvolvimento de aplicações de PCA durante os 25 anos que se seguiram da publicação do artigo de Hotelling. O início do aumento do interesse em PCA é marcado por quatro artigos; e estes se tornaram importantes referências no assunto, como mostra a Tabela 1 [88].

Estes artigos também mostram que, na prática, a aplicação de PCA é muito mais útil para um grande conjunto de variáveis p (apesar de Pearson notar que somente era viável fazer PCA à mão para p menor ou igual a quatro), tanto que,

desde a publicação destes artigos, houve um aumento considerável de aplicações e aprofundamentos teóricos, o que coincide com o advento dos computadores e o uso de técnicas de resolução numérica.

Apesar da simplicidade dessa técnica, muita pesquisa ainda está sendo feita na área de PCA e tem sido amplamente utilizado e aplicado em diversas áreas, que incluem agricultura, biologia, química, climatologia, demografia, ecologia, economia, pesquisa de alimentos, genética, geologia, meteorologia, oceanografia, psicologia, engenharia e outros.

Tabela 4.1: Artigos publicados sobre aplicação de PCA durante os 25 anos que seguiram a publicação do artigo de Hotelling.

Anderson(1963)	Discute a parte teórica relacionada às distribuições assintóticas dos coeficientes e variâncias de CP.
Rao (1964)	Introduz inúmeras idéias com relação ao uso, interpretação e extensões de PCA;
Gowee (1966)	Insere a técnica no contexto da estatística, além de fornecer vistas do ponto de vista geométrico;
Jeffers (1967)	Apresenta o lado prático do assunto, mostra dois estudos em que PCA vai além da ferramenta de redução de dimensionalidade.

4.2.1.2.2 DEFINIÇÃO DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise por componentes principais consiste em um método não supervisionado de análise multivariada dos dados, frequentemente empregadas na análise de dados espectroscópicos para auxiliar na observação de tendências ou fenômenos não perceptíveis por simples observações [141][142].

A análise por componentes principais resulta da construção de um conjunto de novos vetores, ortogonais entre si, chamados de componentes principais. Esses novos componentes, são combinações lineares das variáveis originais, construídos em ordem decrescente de variância, e, portanto, de quantidade de informação, resultantes do agrupamento das variáveis altamente correlacionadas. Sendo assim, as análises por componentes principais reduzem a dimensionalidade do conjunto de dados original de forma que as informações mais relevantes ficam concentradas nas primeiras componentes e as de menor importância nos últimos. Dessa forma, as primeiras componentes principais são suficientes para descrever o sistema, possibilitando que seja facilmente interpretado [143][144].

A análise por PCA é uma poderosa ferramenta de visualização, em que os resultados são mostrados na forma de gráficos bidimensionais ou tridimensionais, conhecidos como gráficos de *scores* em que as amostras são projetadas nos novos eixos, vetores, sendo possível verificar o agrupamento das que são semelhantes entre si e ainda a discriminação em classes (Figura 2) [86][104].

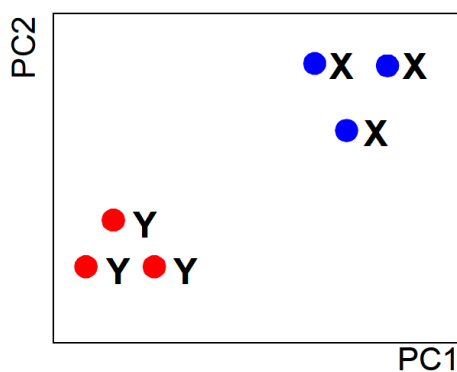


Figura 4.2: Representação da forma de visualização dos resultados de uma análise por componentes principais.

Como não é possível obter informações analisando gráficos multidimensionais de uma só vez, as informações contidas nas componentes principais são visualizadas em gráficos bidimensionais e às vezes tridimensionais. Em um gráfico de scores da primeira componentes principal *versus* a segunda, por exemplo, todas as amostras são alojadas no gráfico na forma de pontos de acordo com suas

coordenadas nessas componentes. Além disso, a análise dos gráficos construídos pelas primeiras componentes principais é suficiente para se extrair as informações sobre o sistema em estudo. Isto se deve ao fato de que as primeiras componentes concentram a maior porcentagem de informações relevantes [86][104].

As análises quimiométricas exploratórias utilizando dados obtidos pelas técnicas de ICP OES e/ou RMN têm sido amplamente empregadas, havendo muitas publicações na literatura, sobre os mais variados temas. Há um grande número de exemplos sobre a utilização dessa ferramenta para a discriminação entre as variedades de produtos agrícolas e também pela origem geográfica e tipos. Neste contexto, foi possível discriminar amostras de cafés [145][146], chás[147][148], vinhos [149][150], azeite de oliva [151], sucos [152], farinha de trigo [153][154] de acordo com a origem geográfica e variedade ou ambas.

Mediante o exposto fica claro que a técnica de ICP OES combinada com a quimiometria é uma ferramenta importante no controle de qualidade e autenticação desses produtos. Essa combinação de estratégias para obtenção e tratamento de dados também pode possibilitar inferências sobre o modo de produção.

4.2.1.2.3 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE INFLUÊNCIAS (LOADINGS)

Quando é observada a distinção entre conjuntos de amostras nas análises por componentes principais, é possível verificar quais foram as variáveis ou fatores que mais contribuíram para que ocorresse a discriminação. Essa informação é obtida pela análise dos gráficos de *loadings* (pesos ou influências), o qual é obtido em conjunto com os gráficos de *scores* e tem por objetivo explicar o resultado desse (*Figura 3*). Quando uma matriz de dados de *scores* e a matriz de *loadings* (pesos ou influência), sendo que a matriz original é o produto da matriz de *scores* pela transposta da matriz de *loadings* [86][104].

$$X = T \times P^T, \text{ onde } T = \text{matriz de } \textit{scores} \text{ e } P^T = \text{matriz de } \textit{loadings}$$

Os vetores de *scores* descrevem a relação entre as amostras no subespaço do modelo e os vetores de *loadings* descrevem a importância de cada descritor dentro do modelo. Ele pode representar graficamente a relação inter-amostras e inter-variáveis e fornecer uma maneira de reduzir a dimensionalidade dos dados. A

correlação de amostras com valores positivos em uma determinada componente principal no gráfico de *scores*, com variáveis também de valores positivos no gráfico de *loadings* referente à mesma componente principal, significa que tais amostras possuem maiores teores dos compostos representados por essas variáveis. Da mesma forma, as amostras com valores negativos apresentam baixa concentração dos mesmos compostos [86][104]. A Figura 3 exemplifica estes conceitos.

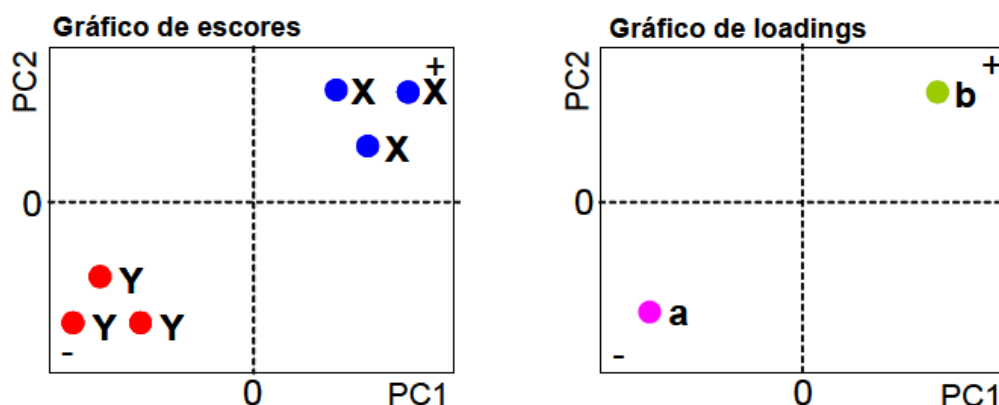


Figura 4.3: Representação de um gráfico de *scores* e seu respectivo gráfico de *loadings*.

Assim a análise dos gráficos de *loadings* possibilita verificar quais os elementos que mais contribuíram para que ocorresse uma determinada discriminação.

4.2.2 CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS OU RECONHECIMENTO DE PADRÕES

Uma vez realizada uma análise exploratória, o resultado obtido pode então ser utilizado para a construção de modelos de classificação, os quais poderão ser empregados para previsão de amostras de origem desconhecida [86][155].

O reconhecimento de padrões, uma das principais vertentes do uso da estatística multivariada em química analítica, viabiliza a obtenção de mais informações quando comparado com os procedimentos univariados que são usualmente adotados.

Os métodos de classificação, ou reconhecimento de padrões, são utilizados para agrupar amostras em categorias segundo suas similaridades, e têm sido amplamente utilizados para identificação e qualificação de matéria prima, investigação de falhas de processo, monitoramento e controle de processos, avaliação de fontes de contaminação em estudos ambientais, e em estudos de formulação e avaliação sensorial de alimentos, bebidas e cosméticos. Estes métodos permitem a construção de modelos de classificação, no qual as informações das amostras tais como o sinal analítico instrumental, a formulação ou características físico-químicas, podem ser associadas a atributos pré-definidos. Uma vez validados, estes modelos são utilizados para classificar novas amostras.

Existem diversos tipos de métodos de classificação sendo que os mais comumente utilizados são os métodos SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) e o método KNN (K-Nearest Neighbor). Estes métodos são baseados na suposição de que o quanto mais as amostras se assemelham entre si em relação às variáveis medidas, mais próximas elas estarão no espaço multidimensional gerado por tais variáveis. O método KNN é bastante simples do ponto de vista matemático enquanto que o método SIMCA é bem mais elaborado e sofisticado, embora ambos sejam capazes de apresentar bons desempenhos.

No método SIMCA, cada classe do conjunto de dados de propriedades conhecidas (conjunto de treinamento) é submetida a uma análise por componentes principais. O número de componentes principais necessário para descrever cada classe é determinado e finalmente, constrói-se uma hipercaixa envolvendo as amostras de cada classe, onde os limites das mesmas são definidos com um dado nível de confiança.

A atribuição da amostra de classe desconhecida é realizada pela projeção desta no espaço dos scores e a verificação do alojamento desta dentro dos limites das hipercaixas. Por outro lado, se a amostra desconhecida não for referente a nenhuma das classes do modelo, esta não será classificada em nenhuma das classes, o que pode ser uma vantagem, quando pouco se conhece sobre a amostra. No entanto, se o modelo não tiver poder de discriminação suficiente a amostra poderá ser classificada como pertencente a mais de uma classe.

O poder discriminatório é dado pela distância entre as classes [86]. Esse método assume que as amostras de uma dada classe tenderão para a distribuição normal. Com o aumento do número de amostras, a distribuição deverá ficar vez mais cada vez mais uniforme e, com isso, resultando em um melhor modelo.

Quando se utiliza o método KNN, a classificação da amostra problema em uma determinada classe é feita pela atribuição de votos, comparando-se a distância desta em relação a cada uma das amostras de uma determinada classe que estiver mais próxima. São usadas as distâncias de Mahalanobis e a Euclidiana. A classe que obtiver o maior número de votos é então determinada como sendo a classe da amostra desconhecida [86] [104].

O método pode ser empregado, utilizando como modelo os dados originais ou o resultado de uma análise por PCA. Esse método, portanto, obrigatoriamente classifica as amostras desconhecidas como pertencentes a uma ou a outra classe.

4.3 APLICAÇÕES DA ANÁLISE MULTIVARIADA EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS

A análise exploratória e métodos de reconhecimento de padrão têm sido amplamente empregados com a finalidade de classificar e discriminar os mais diferentes tipos de amostras.

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas no mercado internacional, havendo grande interesse comercial na sua qualificação. Entre as atribuições de sua qualidade estão a procedência, variedade, aroma, presença de contaminantes químicos entre outros. Martin *et al.*, [93] empregaram com sucesso a técnica de ICP OES na discriminação de cafés verdes do tipo arábica e robusta. Foram determinados 11 elementos sendo que Cu, Mn e P mais contribuíram para a discriminação. Os cafés tipo robusta apresentaram maiores teores de Cu e P enquanto os cafés do tipo arábica se caracterizaram por possuir um maior teor de Mn. Baseados nesse trabalho efetuaram um estudo utilizando as mesmas variáveis na tentativa de discriminar cafés torrados comerciais do tipo arábica e robusta sendo que as variáveis responsáveis pela distinção dos tipos de café foram as mesmas identificadas no trabalho anterior [156].

Ainda nesse contexto, empregaram outras variáveis como polifenóis, aminoácidos livres, extrato aquoso, 5-(hidroximetil) furfural em maior quantidade nos cafés com adição de açúcar. O grupo de amostras com a mistura dos dois tipos se agrupou mais próximo ao grupo de cafés com adição de açúcar no processo de torrefação [157].

Anderson *et al.*, [158] diferenciaram grãos de café de três regiões distintas (Indonésia, África e América Central e Sul) pela análise de 18 elementos (K, Mg, Ca, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, S, Cd, Pb e P) usando ICP OES. A análise por componentes principais demonstrou que apenas um pequeno número de variáveis foi responsável pela pequena variabilidade total dos dados. Apenas um discreto agrupamento surgiu quando os dados foram dispostos nas duas primeiras componentes e uma melhor visualização na origem de sub-regiões foi obtida por análise canônica discriminante e uso de redes neurais (70 – 86% de acerto na classificação).

Santos e Oliveira [159] determinaram a concentração de constituintes minerais e elementos tóxicos por ICP OES em cafés brasileiros solúveis visando verificar a qualidade desses em regiões específicas do país. Foi observado que a maioria das amostras tem composição mineral diferente, resultando em uma dispersão no plano das componentes PC1 *versus* PC2. Contudo, foram identificados 3 agrupamentos. O primeiro constituiu um grupo de amostras caracterizado por maiores teores de Ca, Cu e S; o segundo, envolvendo o maior número de amostras, representando as marcas mais vendidas no Brasil (Paraná, São Paulo e Minas Gerais), caracterizado por maior teor de Na, e o terceiro caracterizado por altos teores de Fe e Al. Entre os agrupamentos foi observado que tratavam-se de amostras do mesmo fabricante.

Dos Santos *et al.*, [160], avaliaram a disponibilidade de nutrientes minerais e elementos tóxicos em cafés produzidos pelas agriculturas orgânica, tradicional e tecnológica no sudoeste da Bahia, Brasil. Os nutrientes minerais foram determinados em amostras de solos e tecidos de café por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e os elementos tóxicos (Cr, Ni, Cd e Pb) por espectrometria de emissão ótica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A aplicação da análise de componentes principais aos resultados analíticos confirmou a importância do “período de conversão”, durante o processo de mudança do manejo da cafeicultura tradicional para orgânica. Duas componentes foram extraídas descrevendo aproximadamente 76% da variância comum. Os resultados possibilitaram inferir que o Cd, Cu, Zn e outros elementos tóxicos contidos nos fertilizantes inorgânicos (utilizados na cafeicultura tradicional e tecnológica), e os níveis relativamente elevados de Cu e Zn presentes nos adubos orgânicos (utilizados na cafeicultura orgânica) podem causar aumentos dos níveis desses elementos nos solos agrícolas, podendo assim, passar para a cadeia alimentar através dos cultivos.

Anderson *et al.*, [161] desenvolveram um método para confirmar a autenticidade geográfica de tomates baseado na determinação de 18 elementos (K, Mg, Ca, Sr, Ba, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, S, Cd, Pb e P) empregando ICP OES em 608 amostras de origem conhecida nas regiões dos EUA e Canadá. Utilizando PCA, apenas um agrupamento discreto foi observado quando os dados foram dispostos em relação às duas primeiras componentes, enquanto uma melhor

visualização foi obtida utilizando análise canônica discriminante. O emprego de redes neurais foi determinante para o desenvolvimento de um modelo eficiente de classificação de acordo com a origem geográfica baseado em pequenas variações na constituição mineral de macro e micro-elementos.

Ervas medicinais são comumente usadas na China para a regulação ou melhoria da função renal. Dessa forma, Kolasani *et al.*, [162], determinaram a concentração elementar de Ca, Mg, Fe, Mn, Na, K e Zn em 50 ervas medicinais chinesas digeridas em ácido nítrico concentrado utilizando a espectrometria de absorção atômica. Os dados foram submetidos à avaliação quimiométrica afim de classificar as amostras e entender a associação entre os elementos. Em todas as amostras analisadas foram encontrados elevados teores de Ca e K em comparação com outros elementos. A PCA foi utilizada como técnica de classificação e gerou duas componentes principais que explicaram 62% da variância total nos dados. A primeira e a segunda componentes relataram 45,2% e 16,8% da variância, respectivamente.

Patras *et al.*, [163] realizaram um estudo afim de verificar as semelhanças e diferenças em frutas e vegetais fazendo uso de ferramentas de reconhecimento de padrões. A classificação foi realizada com base na atividade antioxidante global, nos níveis de grupos de antioxidantes (compostos fenólicos totais, antocianinas totais, ácido ascórbico) e em parâmetros de qualidade (instrumental, cor e umidade). Seis vegetais (brócolis, cenoura, alface, cebola vermelha, cebola amarela) e oito frutas comumente consumidos na Irlanda foram analisados. As inter-relações entre os parâmetros analisados nas diferentes frutas e vegetais foram investigados por análise de componentes principais (PCA). A PCA foi aplicada aos valores padronizados de análise de todos os 14 diferentes tipos de frutas e legumes. A normalização foi necessária devido à diferentes magnitudes da analito. Após a padronização, cada parâmetro contribuiu igualmente para a variância dos dados e teve peso igual no cálculo da componente principal. A PCA revelou que os as duas primeiros componentes principais representaram 62% da variabilidade total na atividade antioxidante nos diferentes grupos. A PC1 explicou 40% da variância total no conjunto de dados, enquanto PC2 explicou 24%. Frutas vermelhas apresentaram o maior potencial anti-radical e níveis totais de fenol como foi indicado pelo PCA. A atividade antioxidante da cenoura, tomate, cereja e alface foram bastante

semelhantes, enquanto que de uva, cebola e brócolis foram caracterizados por baixos níveis de atividade antioxidante.

Muitos trabalhos têm relatado a presença de nutrientes minerais em couve. Fadigas *et al.*, [164] determinaram e avaliaram a composição mineral (Ca, Mg, Fe, Mn e Zn) em couve (*Brassica oleracea L.*) cultivadas em solos de quatro cidades da Bahia, Brasil. O processo de amostragem foi realizada durante o verão e inverno. As amostras foram digeridas com ácido nítrico concentrado e analisadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A análise por componente principal revelou composições minerais diferentes nas amostras coletadas no verão e no inverno. Amostras coletadas no inverno apresentaram maior concentração de micronutrientes (Fe, Zn e Mn) e macronutrientes (Ca e Mg). Devido às diferentes ordens de grandeza das concentrações dos elementos os dados foram auto-escalados. As três primeiras componentes principais foram escolhidas para a modelagem dos dados porque descreveram quase 89% da variância total. Ferro, zinco e manganês são as variáveis dominantes para a primeira componente principal (PC1), e representam 49% do total variância. Estes três elementos contribuíram para a grande variabilidade apresentadas nas amostras e foram correlacionadas positivamente. A segunda componente principal (PC2) foi responsável por 25% da variância total. Magnésio e cálcio são as variáveis mais dominantes. A terceira componente principal, PC3, responsável por 15% da variância total foi essencialmente descrita pela concentração de cálcio e magnésio, mas com inversa correlação. A análise por componentes principais revelou que as amostras coletadas na cidade de Conceição de Jacuípe são diferentes das amostras coletadas nas outras três cidades (Araças, Amélia Rodrigues e Salvador), tendo em vista que as concentrações de ferro, zinco e manganês nestas amostras foram menores.

Froes *et al.*, [165] desenvolveram um método para determinação direta de microelementos em suco de frutas utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. A determinação de minerais em produtos industrializados é bastante importante para garantir a qualidade e autenticidade dos mesmos. O método foi otimizado através de um planejamento fatorial 2³ que avaliou as condições do plasma. Neste trabalho, a análise de componentes principais foi usada para determinar as condições ótimas de análise para todos os elementos a

serem determinados (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn e Zn). As três primeiras componentes explicaram 99% da variância total. A condição de ponto central no planejamento fatorial diferiu das outras condições por PC1 quando um efeito mais significativo estava presente. Esta condição apresentou o maior sinal analítico para todos os elementos. Dois grupos foram formados em função da taxa de fluxo de gás de nebulização e puderam ser diferenciados por PC2. Neste trabalho os resultados obtidos por PCA e HCA foram concordantes e demonstraram que essas duas ferramentas podem ser usadas de forma independente.

Tormem *et al.*, [166] desenvolveram um método simples e rápido para a determinação de Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sr, V e Zn em amostras de sucos de frutas, por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) após diluição da amostra. As composições de 20 amostras foram avaliadas através de técnicas de análise multivariada, entre elas a análise por componentes principais. Os resultados mostraram que as amostras são agrupadas pela marca e não pelo fruto, o que poderia ser devido a características do solo onde a planta foi cultivada e ao diferente processamento e condições de armazenamento utilizado pelas diferentes marcas. Os dados foram pré-processados usando auto-escalamento. As três primeiras componentes principais (PCs) representaram 73,01% da variabilidade total dos dados. As variáveis dominante para PC1 foram Co, Fe, Ni, Mn, Mo e Zn, representando 35,59% da variância total. Em PC1, a distribuição da amostra apresentou-se mais uniforme, com uma distribuição mais contínua das concentrações entre as diferentes marcas. A PC2, explicou 22,82% da variância total, e as variáveis mais significativas, foram relacionadas às concentrações de Ca e Sr. Na PC3, Rb e Na, com carga positiva e negativa, respectivamente, são distinguidos com 15,01% da variância total.

Ferreira *et al.*, [167] determinaram os teores de Ca, Cu, K, Mg, P e S simultaneamente em sucos e refrigerantes de uva utilizando espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado como técnica analítica. Os dados foram submetidos à análise de componentes principais e os resultados mostraram que o Na foi o principal elemento para discriminação entre as amostras, diferenciando principalmente sucos e refrigerantes. A adição de conservantes e o teor de sais minerais também foram aspectos relevantes para a discriminação dos grupos. Um pré-processamento dos dados foi necessário para atribuir pesos

equivalentes aos teores dos analitos nas amostras. Assim, os dados foram auto-escalados antes de serem submetidos à análise de componentes principais (PCA). A PCA mostrou que seria possível descrever 98,7% dos dados com apenas cinco componentes principais, sendo 68,4% da variância total descrita pela PC1, 16,0% por PC2 e 7,2 % por PC3. A análise conjunta mostrou que PC1 separa as amostras em dois grandes grupos, ou seja, amostras com maiores e menores teores de Na. Em PC2 as amostras foram discriminadas em relação aos teores de Na e S e uma análise de PC3 revelou agrupamento de amostras relacionadas a maiores teores de Mg, Ca, K, P e também amostras com maiores teores de S.

A cachaça é uma bebida tipicamente brasileira, apreciada em todo o mundo. Diversos trabalhos têm sido publicados sobre a quantificação de espécies orgânicas e inorgânicas neste tipo de amostra [168][169]. Devido a internacionalização deste tipo de bebida há um grande interesse na determinação de sua origem geográfica visando garantir sua autenticidade e identificar fraudes. Nascimento *et al.*, [170] empregaram espectrometria de absorção e emissão atômica (FAAS e FAES) para a determinação de Li, Na, K, Mg, Ca, Al, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pb e Hg em 74 amostras de cachaça brasileiras e 26 importadas. A determinação dos metais foi realizada pela aspiração direta das amostras (exceto para Al, Hg, Pb e Cd para os quais as amostras foram pré-concentradas), sem tratamento prévio. Contudo, não foi possível a classificação das cachaças de acordo com a origem geográfica aplicando as técnicas de reconhecimento de padrões no conjunto de dados. Os resultados obtidos não possibilitaram a determinação da procedência das cachaças devido a efeitos sazonais, mudanças de fornecedores de cachaça para engarrafamento e similaridades no processo de produção. Falahi *et al.*, analisaram noventa e nove amostras de arroz polido branco cultivadas em três áreas do Irã. Ferro, zinco, cálcio, cobre, chumbo e cádmio foram determinadas empregando espectrometria de absorção atômica (FAAS) [171]. Judprasong *et al.*, determinaram nutrientes e elementos tóxicos em quatro variedades de arroz consumidos na Tailândia [172]. Wang e Li determinaram 27 elementos químicos em dezesseis amostras de arroz chineses e onze amostras de arroz japoneses utilizando ICP OES e ICP-MS como técnicas analíticas para a quantificação. Os resultados foram avaliados por análise de *cluster* [100]. Armenta *et al.*, realizaram um estudo para caracterizar grãos de arroz consumidos em Valência, Espanha. Nas

107 amostras, provenientes de várias cidades espanholas e de outros países foram analisados 32 elementos químicos, e quantificados por ICP OES. A técnica quimiométrica utilizado para avaliação dos resultados foi a análise discriminante linear (LDA) [173]. Anwar *et al.*, determinou a composição mineral do arroz consumido no Paquistão. Os elementos químicos quantificados foram: cálcio, magnésio, zinco, ferro, cobre, alumínio, manganês, sódio, potássio e cromo [174]. Barbosa *et al.*, empregou a técnica de ICP-MS para a quantificação de elementos tóxicos e de nutrientes em vinte e sete amostras de arroz do Brasil [175]. Outros trabalhos também têm sido propostos para a determinação de elementos tóxicos em amostras de arroz. Jiang *et al.*, avaliaram os procedimentos de extração para análise de especiação de arsênio em amostras de arroz utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (HPLC-HG-AFS). Huang *et al.*, propôs um procedimento de extração para a especiação de arsênio em grãos de arroz [176]. La Guardia *et al.*, recentemente propôs um método para a determinação de mercúrio em arroz utilizando CV AFS [177]. Barbosa *et al.*, realizaram um processo de especiação de arsênio em 44 diferentes lotes de arroz de diferentes regiões brasileiras, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência hifenizada com plasma indutivamente acoplado a espectrometria de massa (HPLC-ICP-MS) [178]. Ferreira *et al.*, determinaram cádmio em trinta e quatro amostras de arroz adquiridos em supermercados do Estado da Bahia, Brasil [179].

4.4 OBJETIVOS

4.4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação nutricional de amostras de arroz consumidas no estado da Bahia, Brasil, mediante emprego de técnicas espectroanalíticas.

4.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método analítico para determinar a composição mineral de diferentes amostras de arroz, em função dos elementos Ca, Na, Zn, Mn, Fe, Mg, Sr, K e P empregando ICP OES;
- Investigar o efeito do cozimento no conteúdo mineral das amostras de arroz processadas de diferentes formas;
- Avaliar os resultados obtidos por meio de técnicas multivariadas (PCA e HCA).

4.5 PARTE EXPERIMENTAL

4.5.1 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES)

As análises por ICP OES foram realizadas em um equipamento Varian, modelo Vista PRO, com configuração axial, equipado com uma fonte de rádio frequência (RF) de 40 MHz, um detector Charge Coupled Device (CCD). Uma câmara de *Sturman-Master* e um nebulizador *V-Groove* também foram utilizados. O sistema foi totalmente controlado por computador, com o software “*PE Winlab*”. Como gás do plasma foi utilizado o argônio, com pureza de 99,996 % (White Martins, SP, Brasil).

As condições experimentais de operação do equipamento de ICP OES estão descritas nas Tabelas 2.

Tabela 4.2: Condições experimentais utilizadas no ICP OES.

Parâmetro	Valor / especificação
Potência	1300 W
Vazão do plasma	15,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	1,5 L min ⁻¹
Vazão do nebulizador	0,8 L min ⁻¹
Vazão de bombeamento da amostra	0,7 mL min ⁻¹
Tempo de integração	2,0 s
Tempo de estabilização	15 min
Tempo de leitura	1 min
Replicatas	3
Câmara de nebulização	<i>Sturman-Masters</i>
Nebulizador	<i>V-Groove</i>

Para a determinação de micro e macro elementos nas amostras de arroz, o sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução de referência multielementar e o alinhamento da tocha foi realizado com uma solução de Mn 5,0 mg L⁻¹. As linhas espectrais foram selecionadas considerando as intensidades dos sinais de emissão, sensibilidade e ausência de interferências. Na Tabela XX são listados o comprimento de onda utilizados para determinação de cada analito.

Tabela 4.3: Comprimentos de onda empregados para a análise de amostras de alimentos.

Elemento	Linha de Emissão (nm)
Cálcio (Ca)	422,673
Fósforo (P)	213,618
Magnésio (Mg)	279,553
Manganês (Mn)	257,610
Potássio (K)	766,491
Sódio (Na)	589,592
Estrôncio (Sr)	407,771
Ferro (Fe)	238,204
Zinco (Zn)	213,857

4.5.2 MATERIAIS E REAGENTES

Os materiais (balões volumétricos, béqueres, pipetas, frascos de plástico, etc.) foram limpos antes de sua utilização, deixados em banho de HNO₃ 10 % (v/v) por 12 h, no mínimo, e, em seguida, enxaguados com água ultrapura obtido pelo sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, EUA), apresentando condutividade inferior a 18,2 MΩ cm. Todas as soluções foram preparadas empregando água ultra pura.

Para a avaliação da concentração dos analitos foram preparadas soluções multielementares na concentração de 50 mg L⁻¹ para os micro elementos (Fe, Mn, Zn e Sr) a partir da diluição das soluções padrão de 1000 mg L⁻¹ de cada elemento (Merck, Alemanha). Para os macrossubstâncias (Ca, P, Mg, K e Na) foram preparadas soluções multielementares na concentração de 500 mg L⁻¹ a partir da diluição das soluções padrão de 10.000 ou 4.000 mg L⁻¹ de cada elemento (Merck, Alemanha). Estas soluções foram utilizadas para preparar as curvas de calibração.

Para os procedimentos de mineralização foram usados o ácido nítrico concentrado (após destilação) e peróxido de hidrogênio 30 % (v/v) (Merck (Darmstadt, Germany)).

4.5.3 AMOSTRAS

Dezenove amostras comerciais de arroz foram adquiridas no mercado varejista da cidade de Salvador, Bahia, entre os meses de março e abril de 2011. As amostras obtidas, de diferentes marcas, foram secas à temperatura ambiente em um dessecador e posteriormente armazenadas em frascos de plástico.

4.5.3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS UTILIZANDO BLOCO DIGESTOR/DEDO FRIO

Primeiramente pesou-se 2,0 g de amostra de arroz, parcialmente macerada em pequenos grãos, em tubos de digestão. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de ácido nítrico concentrado e 3,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) para digestão completa das amostras. Os tubos foram colocados em um bloco digestor modelo TECNAL TE 040/25 e, em seguida, os tubos foram tampados com um aparato de vidro denominado “*dedo frio*” a fim de evitar evaporação excessiva do ácido durante aquecimento e prevenir contaminação das amostras. A digestão de cada amostra foi realizada em triplicata, assim como ocorreu com o branco.

Após a digestão, as amostras foram transferidas quantitativamente para recipientes de polietileno e foram diluídas para 10 mL utilizando água ultra pura.

A exatidão do método analítico desenvolvido para a determinação dos elementos químicos foi determinada mediante análise de material e referência certificado (CRM) de farinha de arroz 1568a, adquirido do *National Institute of Standard and Technology* – NIST. O material foi submetido ao mesmo procedimento aplicado às amostras de arroz.

4.5.3.2 COCÇÃO EM FORNO MICRO-ONDAS

Foram cozidos uma única vez aproximadamente 10 g de arroz *in natura* em 20 mL de água ultrapura, em forno de micro-ondas convencional da marca Sanyo modelo EM 604T com frequência de onda de 2450 MHz sob potência máxima (100 MHz), tendo sido, posteriormente, a água desprezada. Utilizou-se o tempo de 12 minutos para a cocção da amostras de arroz.

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.6.1 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO PROPOSTO

Para a determinação de macro e micronutrientes em amostras de arroz por ICP OES pelo método proposto foram considerados os seguintes parâmetros de méritos: a linearidade, a faixa dinâmica linear, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

Os resultados encontrados a partir das curvas analíticas estão apresentados resumidamente na Tabela 4.4. Os coeficientes de correlação são superiores a 0,99, o que implica na linearidade das curvas conforme condições recomendadas pela ANVISA e INMETRO.

Tabela 4.4: Coeficientes de correlação e faixa dinâmica obtidas a partir do método desenvolvido para determinação do metais por ICP OES.

Elemento	R ²	Faixa dinâmica (mg L ⁻¹)
Ca	0,9997	1,42 – 10,0
K	0,999	0,80 – 100
Mg	0,9995	1,70 – 100
Na	0,9996	0,70 – 10
P	0,9999	1,4 – 100
Fe	0,9998	0,12 - 10
Mn	0,9998	0,13 – 10
Sr	0,9994	0,20 – 100
Zn	0,9998	0,20 – 10

Na Tabela 4.5, são apresentados os limites de detecção e quantificação para o método de determinação de macro e micronutrientes em amostras de arroz.

A exatidão do método proposto foi avaliada utilizando material de referência certificado de farinha de arroz NIST 1568a. Os valores encontrados foram então

comparados aos valores certificados pelo material de referência, como mostra a Tabela 4.6.

Tabela 4.5: Limites de detecção e quantificação para determinação das espécies metálicas por ICP OES.

Elemento	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)
Ca	0,42	1,42
K	0,23	0,80
Mg	0,54	1,70
Na	0,20	0,70
P	0,40	1,40
Fe	0,30	0,12
Mn	0,04	0,13
Sr	0,02	0,12
Zn	0,06	0,20

Tabela 4.6: Concentrações dos elementos presente no material de referência certificado de farinha de arroz NIST 1568a.

Elemento	Valor certificado	Valor encontrado
Cálcio (%)	0,0116 ± 0.0006	0,0118 ± 0.0006
Potássio (%)	0,126 ± 0.004	0,1280 ± 0.0008
Magnésio (%)	0,0554 ± 0.0005	0,056 ± 0.002
Sódio (%)	6,81 ± 0.97	6,60 ± 0.80
Fósforo (%)	0,154 ± 0.009	0,153 ± 0.008
Ferro (mg kg ⁻¹)	7,5 ± 0.4	7,4 ± 0.9
Manganês (mg kg ⁻¹)	19,8 ± 0.6	20,0 ± 1.6
Zinco (mg kg ⁻¹)	19,8 ± 0.8	19,4 ± 0.5

Por meio da análise estatística, os resultados obtidos através do material de referência certificado foram comparados aos valores encontrados por ICP OES aplicando-se o teste *t-student* para cada um dos elementos com nível de confiança de 95%, onde $t_{\text{calculado}}$ apresentou-se sempre menor que o t_{tabelado} . Assim, a comparação estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os valores certificados e os valores encontrados para os elementos estudados presentes no material de referência certificado.

4.6.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DO ARROZ USANDO ICP OES

O trabalho experimental envolveu a análise de seis amostras de arroz integral, sete amostras de arroz parboilizado e seis amostras de arroz branco. Todas as amostras foram analisadas em triplicada. Algumas amostras foram também cozidas, a fim de comparar o efeito da cocção sobre a composição mineral do arroz.

As Tabelas 4.7, 4.8 e 4.9 mostram os resultados obtidos para cada triplicada, durante a determinação de cálcio, potássio, magnésio, sódio, fósforo, ferro, estrôncio, manganês e zinco nas amostras de arroz integral, arroz branco e parboilizado, quando cru e cozido.

4.6.3 AVALIAÇÃO DOS DADOS EMPREGANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) E ANÁLISE HIERÁRQUICA DE DADOS (HCA)

A avaliação dos resultados obtidos após a determinação dos analitos por ICP OES foi realizada com o auxílio do software *Statistica 7.0*. Assim, para a avaliação dos resultados obtidos usando PCA, a primeira etapa, chamada de pré-processamento, envolveu a montagem de uma matriz de dados 114x9 construída envolvendo todos os dados das Tabelas 4.7, 4.8 e 4.9. Nessa matriz as informações referentes às amostras de arroz foram dispostas em linhas enquanto que as informações referentes às variáveis foram dispostas em colunas.

Tabela 4.7: Composição mineral do arroz integral cru e cozido (mg kg⁻¹); B – Integral; R - cru; C – cozido.

Amostra	Ca	K	Mg	Na	P	Fe	Mn	Sr	Zn
CB1.1	389,30	2689,50	565,40	583,20	2523,30	11,26	30,68	1,44	23,78
CB1.2	402,30	2886,30	536,70	564,60	2509,30	11,42	34,32	1,46	23,56
CB1.3	407,20	2728,50	562,30	565,50	2516,90	11,46	28,45	1,32	22,85
CB2.1	416,30	1931,30	701,30	640,70	1803,20	9,81	15,97	1,67	18,57
CB2.2	418,90	1952,50	705,90	654,20	1816,20	10,12	17,01	1,87	19,98
CB2.3	408,60	1947,90	687,00	641,60	1758,30	10,31	16,08	1,98	19,90
CB3.1	387,10	2286,30	358,70	357,60	1859,70	7,62	17,80	0,97	22,87
CB3.2	389,70	2304,20	384,20	374,20	1786,10	7,82	19,70	1,01	23,54
CB3.3	412,40	2306,80	344,30	368,90	1741,30	7,81	17,40	0,85	22,76
CB4.1	389,90	2947,20	948,20	418,40	1836,20	9,46	20,76	1,29	23,81
CB4.2	404,60	2786,90	967,80	412,60	1815,60	9,61	23,21	1,15	22,83
CB4.3	416,30	2759,80	959,50	411,60	1799,80	9,58	19,39	1,41	21,14
CB5.1	379,40	2876,50	443,80	382,30	2065,40	7,23	15,78	1,27	24,46
CB5.2	403,70	3001,90	448,60	364,70	2086,70	7,12	17,42	1,25	25,54
CB5.3	382,40	3043,30	445,30	382,20	2061,50	7,10	16,06	1,06	23,10
CB6.1	382,30	2010,40	424,50	398,10	1797,20	7,19	27,90	1,02	19,39
CB6.2	403,20	2025,60	434,60	392,10	1982,10	7,32	32,80	1,26	19,64

Continuação da Tabela 4.7: Composição mineral do arroz integral cru e cozido (mg kg⁻¹); B – Integral; R - cru; C – cozido.

CB6.3	373,90	1950,20	413,80	393,90	1564,30	7,21	29,30	1,09	20,68
RB1.1	473,40	3372,40	668,90	659,70	2898,00	12,98	32,87	1,39	23,65
RB1.2	472,90	3369,20	670,30	667,80	2919,60	12,39	30,87	1,39	24,27
RB1.3	480,80	3385,50	688,20	676,80	3022,80	11,86	30,44	1,54	21,29
RB2.1	490,10	2345,60	828,20	759,30	2150,40	10,37	16,93	2,12	19,88
RB2.2	489,40	2364,30	829,20	763,50	2099,10	10,98	18,87	2,02	21,57
RB2.3	495,90	2316,10	817,60	777,60	2314,90	11,98	16,16	1,86	20,02
RB3.1	468,70	2740,50	432,70	427,90	2140,30	8,20	19,88	1,12	22,99
RB3.2	470,20	2739,40	430,40	422,50	2124,00	8,45	20,78	1,35	23,89
RB3.3	465,10	2790,20	419,10	456,70	2044,10	8,15	18,02	1,08	21,32
RB4.1	481,30	3469,20	1132,0	501,50	2140,40	11,44	22,89	1,29	22,67
RB4.2	483,70	3356,40	1119,0	525,40	2160,40	10,45	27,98	1,18	23,87
RB4.3	492,10	3589,80	1188,5	498,90	2170,80	10,70	22,94	1,44	21,25
RB5.1	433,10	3345,60	542,30	435,50	2420,50	7,99	19,89	1,17	24,73
RB5.2	435,40	3528,90	533,00	452,40	2439,40	7,76	20,98	1,09	23,90
RB5.3	435,90	3483,90	557,90	478,00	2422,00	8,16	19,10	0,96	23,49
RB6.1	462,16	2368,50	510,20	472,00	2254,40	8,10	33,67	1,29	19,03
RB6.2	463,40	2575,60	498,00	486,60	2587,40	8,25	34,73	1,28	18,98
RB6.3	469,14	2259,50	500,20	466,40	2237,70	8,14	32,27	1,08	19,05

Tabela 4.8: Composição mineral do arroz branco cru e cozido (mg kg⁻¹); W – branco; R - cru; C cozido.

Amostra	Ca	K	Mg	Na	P	Fe	Mn	Sr	Zn
CW1.1	320,30	832,10	186,90	324,20	687,90	2,89	9,71	0,17	13,56
CW1.2	323,50	865,20	165,90	311,80	701,30	3,07	9,43	0,20	12,78
CW1.3	310,80	836,80	169,80	304,80	685,30	3,16	9,39	0,19	13,71
CW2.1	229,30	849,30	86,30	364,60	367,80	2,11	7,54	0,04	12,68
CW2.2	231,40	864,50	82,60	352,40	392,10	2,09	7,32	0,04	14,67
CW2.3	222,40	819,50	79,60	359,10	379,80	2,19	7,49	0,05	12,08
CW3.1	351,10	976,40	157,90	239,60	626,50	1,82	7,72	0,15	14,78
CW3.2	353,70	987,50	151,40	251,60	652,50	1,65	7,91	0,17	15,87
CW3.3	344,60	921,50	152,40	233,90	617,60	1,81	6,93	0,16	16,79
CW4.1	217,50	759,70	99,30	318,90	474,30	1,54	11,24	0,18	14,87
CW4.2	221,50	771,10	102,30	313,50	456,70	1,38	11,32	0,19	14,89
CW4.3	207,20	758,80	102,10	312,60	457,70	1,31	10,95	0,12	15,39
CW5.1	337,10	1056,70	146,20	216,70	398,70	2,87	14,10	0,30	15,83
CW5.2	345,30	1061,30	154,90	223,40	402,60	3,10	14,90	0,33	16,94
CW5.3	341,80	1023,90	139,40	217,50	382,80	3,12	12,91	0,32	17,57
CW6.1	330,90	1049,80	136,90	371,20	747,60	3,42	7,62	0,33	14,28
CW6.2	322,40	1086,20	142,60	357,40	772,30	3,19	7,45	0,27	13,69
CW6.3	331,60	1050,00	137,20	371,80	768,50	3,14	7,58	0,33	12,48

Continuação da Tabela 4.8: Composição mineral do arroz branco cru e cozido (mg kg⁻¹); W – branco; R - cru; C cozido.

RW1.1	364,60	1011,20	202,30	359,40	816,20	3,29	11,68	0,19	13,78
RW1.2	366,20	1102,30	204,70	370,50	823,40	3,46	12,56	0,19	14,89
RW1.3	355,20	1027,00	197,80	364,20	821,30	3,29	11,24	0,18	14,41
RW2.1	257,80	1001,40	107,90	421,50	448,50	2,28	8,24	0,04	14,09
RW2.2	256,40	998,70	110,80	410,80	453,50	2,54	8,79	0,05	13,87
RW2.3	253,20	991,50	99,20	424,70	448,60	2,29	7,93	0,05	12,90
RW3.1	391,30	1156,20	184,60	276,60	743,60	1,57	7,99	0,18	15,78
RW3.2	394,60	1153,40	175,30	274,80	749,60	1,56	7,98	0,17	16,67
RW3.3	396,40	1167,10	184,00	284,10	730,40	1,82	8,36	0,13	15,02
RW4.1	239,30	906,40	116,90	370,40	562,40	1,54	11,99	0,17	17,78
RW4.2	241,50	910,60	118,50	367,40	569,40	1,62	12,78	0,16	16,87
RW4.3	242,80	905,80	110,50	377,90	568,30	1,73	10,90	0,14	16,52
RW5.1	383,40	1240,40	160,40	259,30	469,00	3,30	13,98	0,34	17,87
RW5.2	386,60	1254,60	155,70	251,40	461,50	3,57	14,89	0,31	18,89
RW5.3	385,90	1249,90	157,90	275,00	472,60	3,26	15,44	0,31	17,60
RW6.1	372,60	1276,30	164,30	430,40	907,40	3,62	7,98	0,33	14,87
RW6.2	368,10	1273,50	162,80	429,50	916,50	3,51	6,89	0,35	15,89
RW6.3	382,50	1273,40	169,70	439,40	907,00	3,87	8,29	0,31	14,73

Tabela 4.9: Composição mineral do arroz parboilizado cru e cozido (mg kg⁻¹); P: parboilizado; R: cru; C: cozido.

Amostra	Ca	K	Mg	Na	P	Fe	Mn	Sr	Zn
CP1.1	110,40	2302,70	346,70	89,10	1402,60	7,46	6,76	0,87	6,26
CP1.2	112,30	2407,30	329,20	101,40	1490,70	7,64	7,01	0,84	5,99
CP1.3	101,90	2591,20	329,40	80,40	1556,50	7,67	6,84	1,14	7,26
CP2.1	151,10	1301,20	256,80	109,50	782,60	4,02	4,19	0,49	8,78
CP2.2	154,30	1403,40	272,30	110,70	756,40	3,82	4,42	0,47	8,29
CP2.3	156,00	1298,00	243,30	102,00	752,70	3,98	4,26	0,56	8,63
CP3.1	108,10	2050,30	361,30	49,70	1502,60	4,82	6,36	0,40	8,10
CP3.2	103,40	2010,90	382,40	57,30	1507,60	4,62	6,62	0,44	7,89
CP3.3	106,20	1999,10	385,60	48,40	1470,70	4,69	6,34	0,50	8,87
CP4.1	94,20	1308,90	248,90	49,10	1208,40	5,36	4,82	0,61	10,67
CP4.2	97,40	1502,40	280,60	44,90	1206,70	5,62	4,91	0,60	11,23
CP4.3	90,70	1456,10	250,50	46,10	1126,60	4,86	4,43	0,63	10,70
CP5.1	112,40	1678,30	324,70	81,50	1236,20	3,76	6,62	0,79	7,38
CP5.2	116,10	1702,30	314,90	84,60	1182,30	3,92	6,37	0,79	7,29
CP5.3	115,60	1657,70	309,60	77,60	1137,40	3,96	6,30	0,84	7,69
CP6.1	91,30	2021,10	287,90	65,90	1634,50	5,14	5,82	0,10	10,54
CP6.2	93,70	2034,90	285,60	71,30	1656,30	5,21	5,56	0,13	10,78
CP6.3	88,60	1980,90	308,70	64,70	1647,20	5,22	5,51	0,11	12,29
CP7.1	159,20	1849,60	346,20	103,90	1634,70	4,82	3,86	0,69	14,28
CP7.2	162,10	1972,60	371,20	108,60	1643,20	4,68	3,91	0,71	13,89
CP7.3	152,10	1853,90	351,60	106,40	1579,40	4,63	3,60	0,75	13,97

Continuação da Tabela 4.9: Composição mineral do arroz parboilizado cru e cozido (mg kg⁻¹); P: parboilizado; R: cru; C: cozido.

RP1.1	117,30	2345,30	358,30	94,80	1609,30	7,44	7,50	0,87	6,78
RP1.2	118,10	2432,80	356,70	98,20	1590,80	7,54	8,09	0,85	5,99
RP1.3	114,70	2254,20	356,60	97,20	1634,10	8,18	7,91	0,96	6,79
RP2.1	167,90	1349,80	269,80	112,80	910,30	4,27	4,78	0,51	8,98
RP2.2	165,70	1354,80	273,40	116,70	918,90	4,38	4,90	0,50	9,03
RP2.3	171,30	1377,80	267,70	110,70	915,50	3,82	5,39	0,54	9,42
RP3.1	112,90	2276,30	374,50	49,70	1720,60	4,27	6,87	0,44	8,30
RP3.2	115,30	2301,20	372,50	58,10	1724,60	4,37	6,19	0,43	8,19
RP3.3	113,20	2178,80	374,40	54,50	1758,00	4,15	6,81	0,46	8,41
RP4.1	102,90	1321,00	278,50	46,40	1470,20	5,43	4,98	0,60	11,90
RP4.2	104,60	1318,00	280,50	43,50	1475,40	5,83	4,82	0,54	11,67
RP4.3	99,70	1306,00	278,90	45,30	1474,00	5,79	4,50	0,54	12,05
RP5.1	127,30	2019,00	338,60	78,60	1390,40	4,67	6,30	0,82	7,09
RP5.2	126,90	2023,00	342,40	73,40	1381,80	5,09	6,10	0,81	7,87
RP5.3	125,30	2000,00	337,50	77,10	1391,80	4,35	6,30	0,85	7,45
RP6.1	96,70	2160,00	310,40	67,80	2042,30	5,87	5,99	0,83	10,98
RP6.2	97,90	2154,00	311,40	74,50	2040,50	5,67	5,83	0,80	11,67
RP6.3	100,30	2154,00	307,30	68,60	2051,60	4,90	6,49	0,82	10,99
RP7.1	172,50	1920,10	352,40	110,40	1870,30	4,90	3,89	0,76	12,90
RP7.2	173,40	1922,30	351,60	108,85	1871,30	4,99	3,98	0,73	11,67
RP7.3	165,30	1911,30	348,10	127,65	1880,40	5,18	4,57	0,80	11,60

A técnica empregada para a realização do pré-processamento foi o auto-escalamento, uma vez que havia diferentes ordens de magnitude de concentração dos elementos. Esse tipo de pré-processamento foi possível devido ao fato de todas as variáveis possuírem igual importância, fornecendo assim a possibilidade de se discriminar as amostras.

Considerando que todas as variáveis são altamente correlacionadas na primeira componente principal, a rotação varimax foi usada para facilitar a interpretação dos dados.

O método varimax é um método de rotação ortogonal e pretende que, para cada componente principal, existam apenas alguns pesos significativos e todos os outros sejam próximos de zero. Dessa forma, esse método tem como objetivo maximizar a variação entre os pesos de cada componente principal, daí o nome Varimax.

Através da análise de PCA (Figura 4.4), foi possível observar a discriminação dos três grupos de arroz analisados: branco, integral e parboilizado. A primeira componente principal explica 61,1% da variância total dos dados. As variáveis de maior peso para a PC1 são os seguintes: cálcio (- 0,7249); magnésio (- 0,8599); sódio (- 0,7407); fósforo (- 0,8261); ferro (- 0,9164); manganês (- 0,8525); estrôncio (- 0,8775) e zinco (- 0,7820). A segunda componente principal (PC2) responde por 19,8% da variância total. Desta forma, as duas primeiras componentes principais podem explicar os dados descrevendo 87,89% da variância total.

Através da Figura 4.4, observa-se também uma ligeira separação entre as amostras de arroz cru e cozido.

A PCA revelou que as amostras de arroz integral possuem maior teor de minerais do que as amostras de arroz branco e parboilizado. A concentração de cálcio, sódio, zinco e manganês em amostras de arroz branco são mais elevadas do que em amostras de arroz parboilizado, enquanto que o arroz parboilizado possui maior teor de ferro, magnésio, estrôncio, potássio e fósforo.

A fim de avaliar a influência do cozimento na composição mineral das amostras de arroz, os três grupos de arroz analisados (integral, parboilizado e branco) foram estudados separadamente.

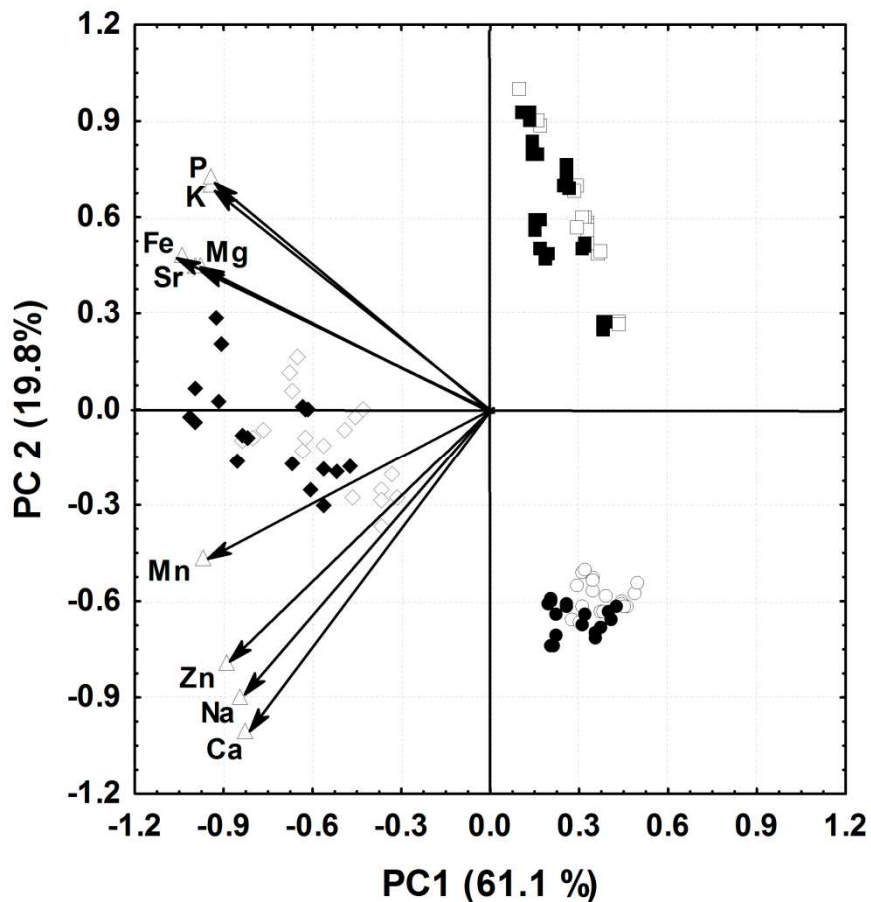


Figura 4.4: Gráfico *biplot* PC1xPC2 correspondentes à classificação das amostras de arroz branco (■), parbolizado (◆) e integral (●), entre cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).

4.6.3.1 ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE ARROZ INTEGRAL

A análise das componentes principais foi aplicada sobre o conjunto de dados, gerados a partir dos resultados da análise das amostras de arroz integral cru e cozido.

As duas primeiras componentes principais explicam 65% de toda a variância dos dados, sendo que as variáveis de maior peso na PC1 são: Na (- 0,88), Fe (- 0,90) e Sr (- 0,70), na PC2: K (0,87) e Zn (0,77) e na PC3: Mn (-0,82).

A Figura 4.5 mostra que existe diferenças nas amostras cozidas, o que é comprovado pelo deslocamento sistemático das mesmas para a direita na PC1, ou seja, as concentrações de Na, Fe e Sr diminuem. A PC2 separou as amostras RB2 por apresentar menores concentrações de K e Zn.

Para complementar a discriminação das amostras, obtida pela análise de componentes principais, aplicou-se a análise de agrupamento hierárquico à matriz de dados, onde foi possível observar a discriminação entre amostras de mesma marca de arroz cru e cozido (Figura 4.6).

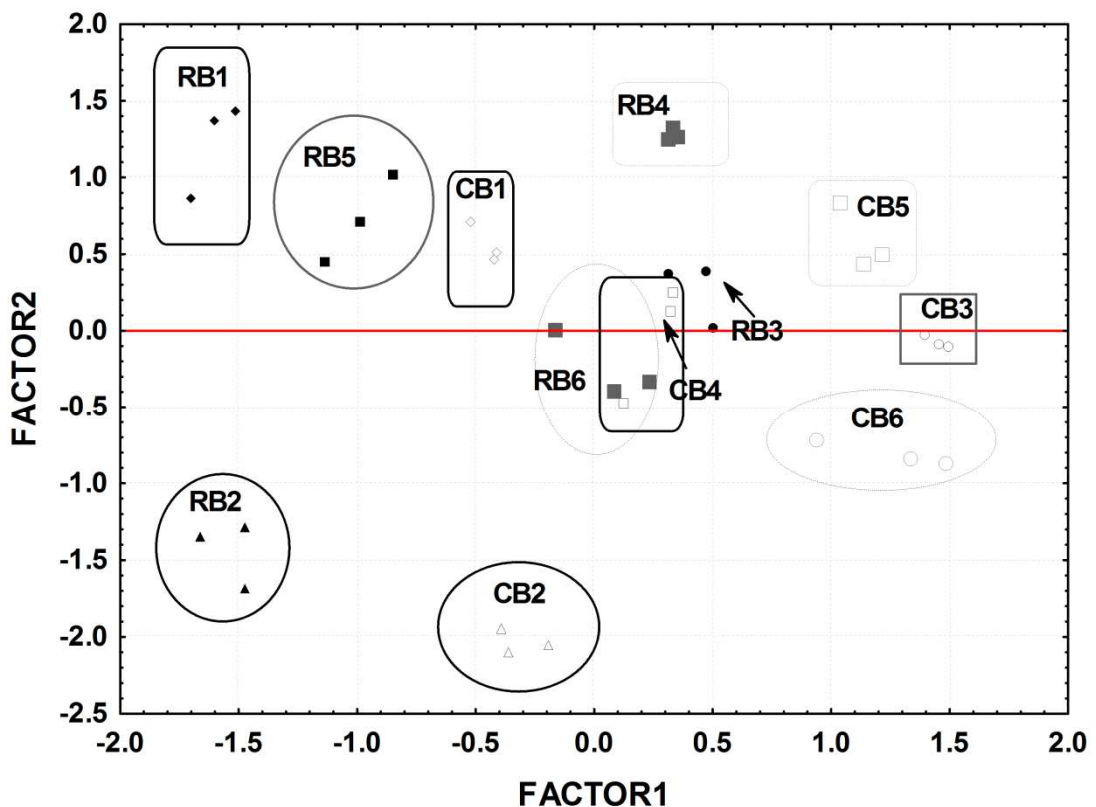


Figura 4.5: Gráfico de escores correspondentes à classificação das amostras de arroz integral, entre cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).

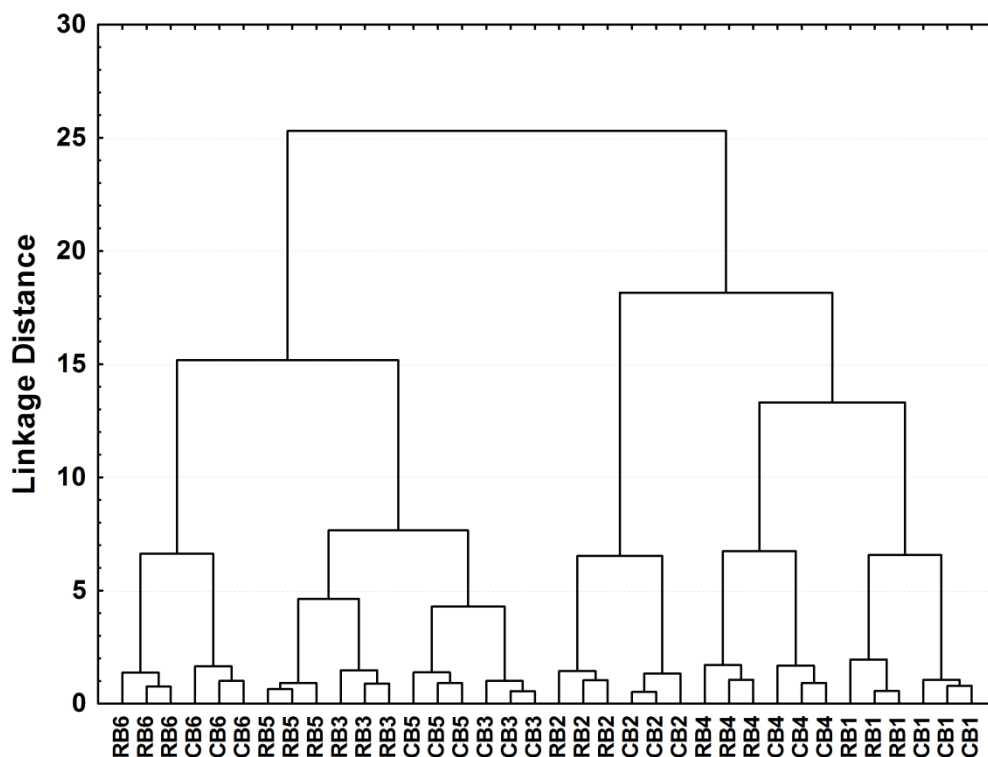


Figura 4.6: Dendrograma correspondente à classificação de amostras de arroz integral (B); R: amostras de arroz cru; C: amostras de arroz cozido.

4.6.3.2 ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE ARROZ BRANCO

As duas primeiras componentes principais explicam 70,7% de toda a variância dos dados gerados para a PCA das amostras de arroz branco cru e cozido, sendo que as variáveis de maior peso na PC1 são: Ca (-0,93), K (-0,84), Mg (-0,84), Fe (-0,70), e Sr (-0,80), na PC2: Na (0,75), Mn (-0,77) e Zn (-0,75) .

O agrupamento das amostras, como mostra o gráfico de escores para as 2 primeiras componentes principais (Figura 4.7), revela que existem diferenças nas amostras de arroz cozidas em relação às amostras de arroz cru. Observa-se um deslocamento sistemático para a direita na PC1 das amostras cozidas.

As amostras das marcas W2 e W4 estão situadas à direita na PC1, enquanto que as demais estão deslocadas a esquerda na PC1. As amostras da marca W6, localizada na região positiva da PC2 tem maior contribuição de Na, enquanto que as

amostras W4 e W5 localizadas na região negativa da PC2 apresentam maior contribuição de Mn e Zn.

Os resultados das separações das marcas e processamento das amostras são confirmados pela análise hierárquica (Figura 4.8). Diante deste estudo foi possível observar que as variáveis que discriminam as amostras do arroz branco não são as mesmas responsáveis por discriminar o arroz integral.

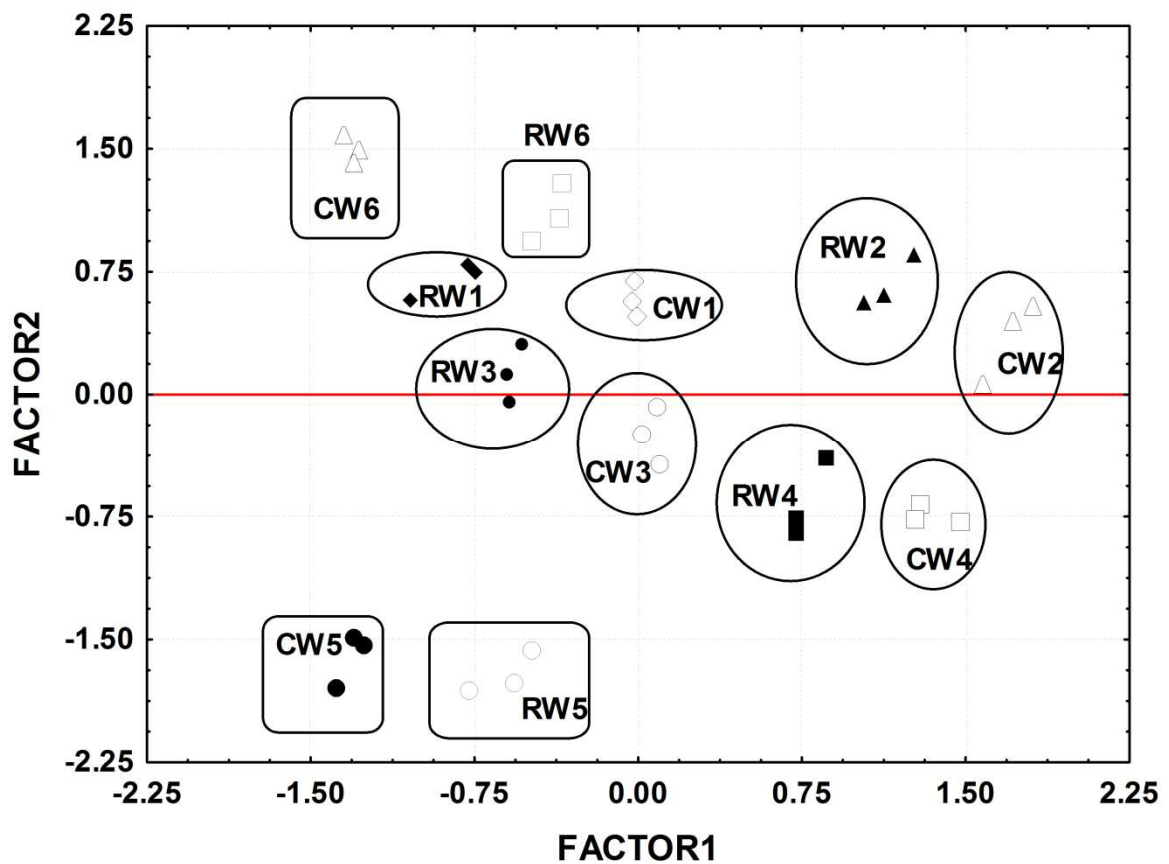


Figura 4.7: Gráfico de escores correspondentes à classificação das amostras de arroz branco, entre cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).

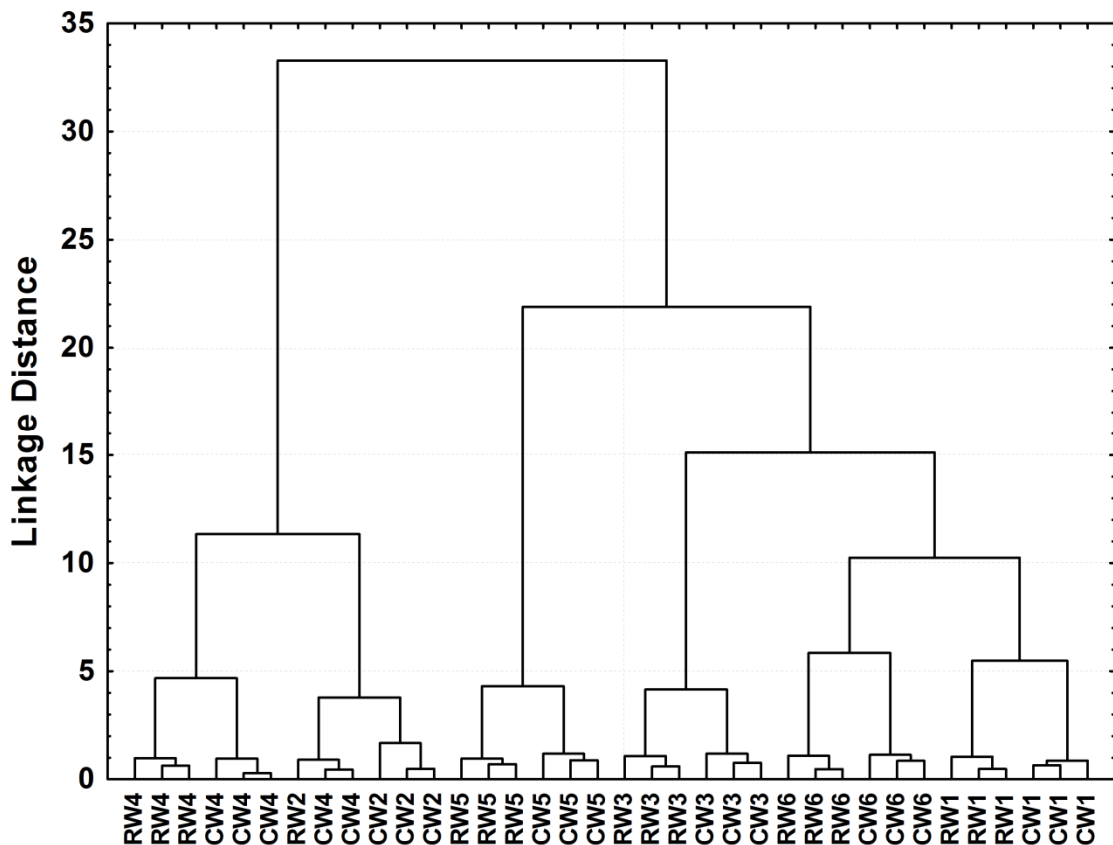


Figura 4.8: Dendrograma correspondente à classificação de amostras de arroz branco (W); R: amostras de arroz cru; C: amostras de arroz cozido.

4.6.3.3 ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA ÀS AMOSTRAS DE ARROZ PARBOILIZADO

A análise de componentes principais aplicada na matriz de correlações dos teores de minerais no arroz parboilizado, permitiu a identificação de três componentes principais, sendo que as duas primeiras componentes principais explicaram 61% de toda a variância dos dados, como mostra a Figura 4.9. As variáveis de maior peso na PC1 são: K (-0,90) e Mn (-0,85), na PC2 são: Ca (-0,80) e Na (-0,90) e na PC3 são: P (-0,75) e Zn (0,82).

As amostras situadas na região negativa da PC1 têm maior contribuição das variáveis K e Mn. As concentrações de cálcio e sódio são importantes para discriminar as amostras P3, P4 e P6, das amostras P1, P2 e P7.

Os resultados das separações das marcas e processamento das amostras são confirmados pela análise hierárquica (Figura 4.10).

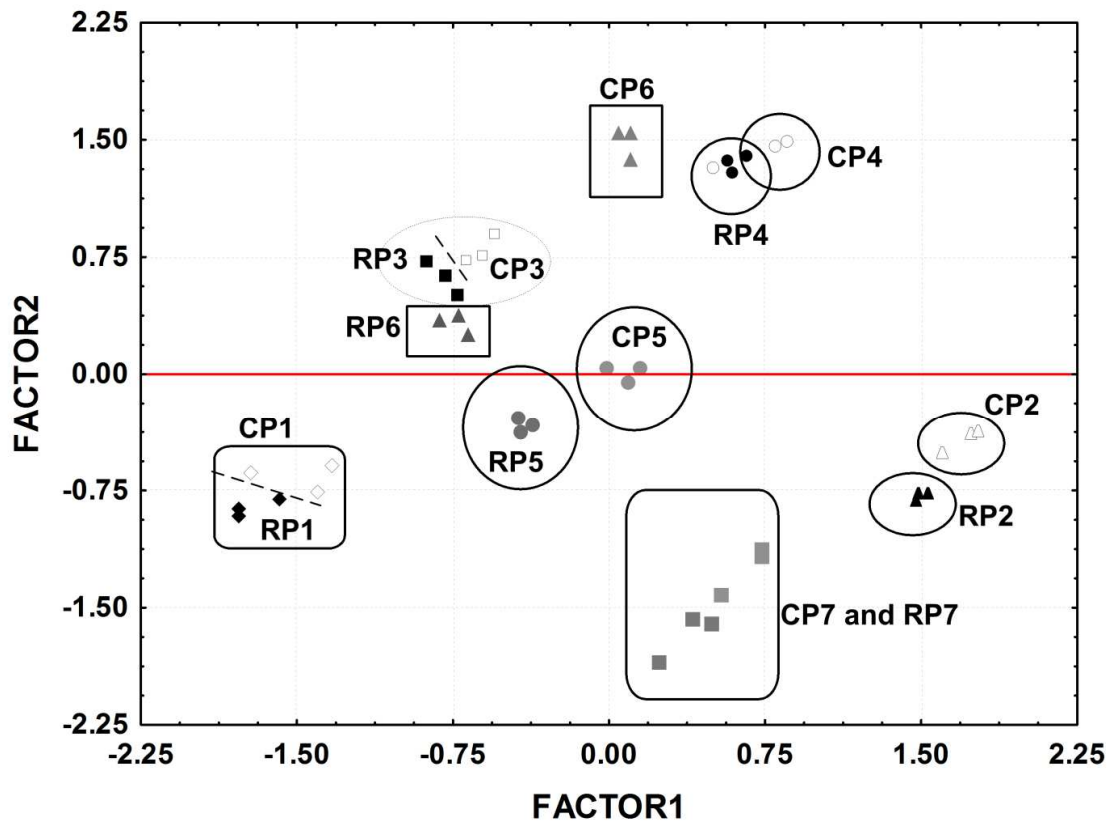


Figura 4.9: Gráfico de scores correspondentes à classificação das amostras de arroz parbolizado, entre cru (símbolos cheios) e cozido (símbolos vazios).

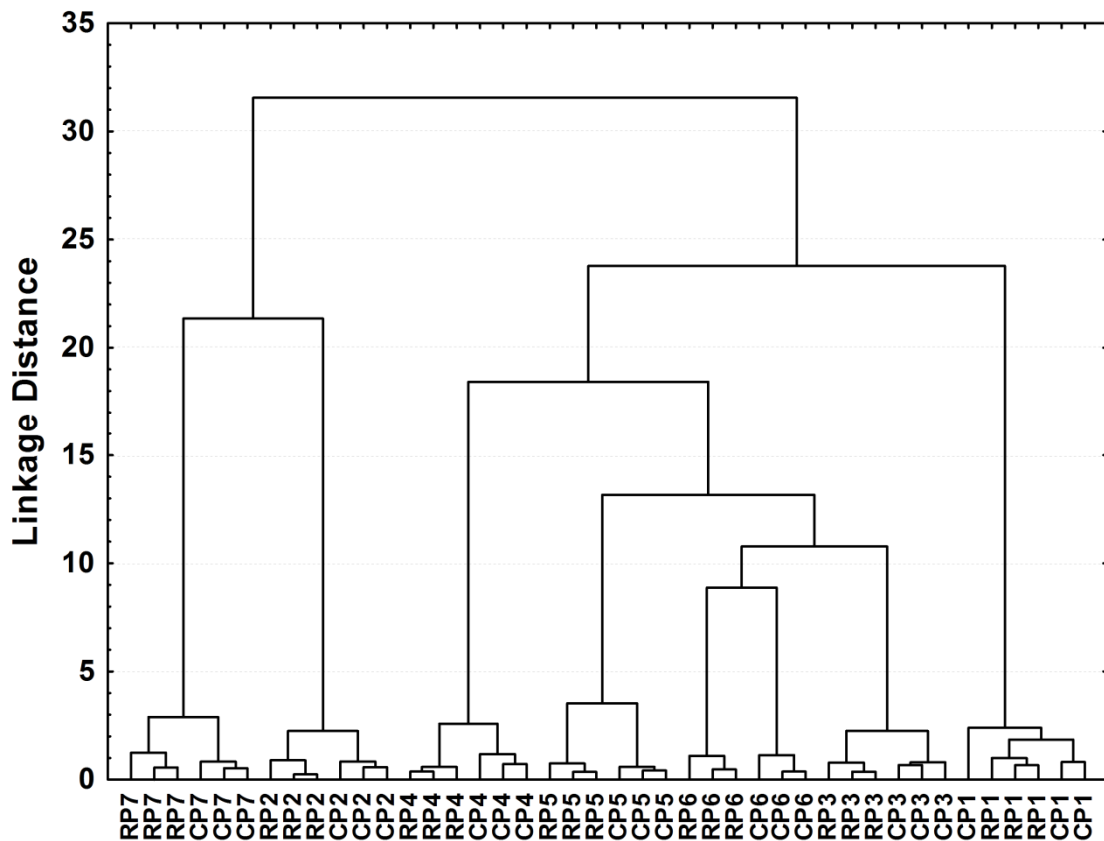


Figura 4.10: Dendrograma correspondente à classificação de amostras de arroz parboilizado (P); R: amostras de arroz cru; C amostras de arroz cozido.

4.6.4 CONCENTRAÇÃO MINERAL DETERMINADA NAS AMOSTRAS DE ARROZ

A avaliação dos dados analíticos obtidos empregando PCA e HCA mostraram que a composição mineral de arroz integral, arroz branco e arroz parboilizado são estatisticamente diferentes.

As concentrações médias e intervalos de concentração para os elementos: potássio, cálcio, magnésio, sódio, fósforo, ferro, estrôncio, manganês e zinco encontrados para o arroz integral, branco e parboilizado em amostras cruas comercializadas em Salvador, Bahia, Brasil, são apresentados na Tabela 4.10.

A partir dos resultados obtidos foi possível inferir que o arroz integral possui maior concentração de minerais quando comparado ao arroz branco e ao arroz parboilizado.

Essa diferença na concentração pode estar relacionada ao fato dos nutrientes presentes nas diferentes frações do grão de arroz não se apresentarem

uniformemente distribuídos. De forma geral, os minerais apresentam-se em maior concentração nas camadas externas do grão de arroz.

Assim, devido ao fato do arroz integral passar apenas pela etapa de descascamento, isso provavelmente impede a redução de nutrientes presentes nos grãos.

O arroz branco, em seu processamento além de descascado é também polido. Nesse processo, os elementos presentes na camada mais externa do grão podem ser removidos, provocando a sua diminuição, originando assim diferenças na composição mineral entre o arroz integral e o branco. No entanto, embora o arroz integral tenha maior concentração de minerais do que o polido, isso não significa necessariamente maior quantidade de minerais absorvidos pelo organismo, visto que a biodisponibilidade pode ser afetada pela presença de maiores teores de fibra e ácido fítico no arroz integral [22].

Nas amostras de arroz parboilizado, observou-se aumento no conteúdo mineral quando comparado ao arroz branco. Este resultado pode basear-se no fato de que, durante o processamento do arroz parboilizado ocorre migração de minerais das camadas externas para o endosperma [21]. Entretanto, observa-se concentrações diferenciadas ao analisar individualmente os minerais. Maiores concentrações de potássio, magnésio, fósforo e ferro são verificadas no arroz parboilizado quando comparado ao branco. Por outro lado, as concentrações de cálcio, sódio, manganês e zinco são menores. Essas observações revelam que os minerais apresentam diferentes padrões de migração durante a parboilização, afetando diferentemente sua concentração nos grãos.

Em todos os três tipos de arroz analisados o nível de potássio é o mais elevado entre os demais elementos e, contrasta principalmente com a concentração de sódio e cálcio que são muito baixos, como mostra a Figura 4.11. Dessa forma, diante dos resultados obtidos recomenda-se qualquer um dos três tipos de arroz para dietas com baixo teor de sódio. O mesmo não é recomendado para o cálcio, visto que como este elemento é fundamental para a formação do esqueleto, uma dieta pobre em cálcio estaria associada à diminuição da densidade óssea e à osteoporose.

Em ordem decrescente, seguindo o potássio, a concentração de fósforo e magnésio são os elementos com maior concentração nas amostras de arroz. Teores elevados de fósforo são um fato esperado neste tipo de amostra visto que a maioria dos solos agricultáveis no mundo são deficientes em fósforo e isso limita, por exemplo, a produção das culturas de arroz. Nesse sentido, usualmente aplica-se fósforo no solo como fertilizante o que pode ocasionar a absorção e a concentração deste micronutriente no cereal.

De modo geral, os resultados obtidos encontram-se concordantes com faixas de concentração descritas na literatura. Dessa forma é possível concluir que os resultados gerados podem contribuir para o conhecimento da composição mineral da matriz de estudo.

Tabela 4.10: Composição mineral do arroz integral, branco e parboilizado para amostras cruas (mg Kg⁻¹)

Elemento	Arroz Integral		Arroz Branco		Arroz Parboilizado	
	Média	Faixa de concentração	Média	Faixa de concentração	Média	Faixa de concentração
Cálcio	470	433 – 496	335	239 – 396	128	97 – 173
Potássio	2967	2260 – 3590	1105	906 – 1276	1909	1306 – 2433
Magnésio	687	419 – 1189	155	99 – 205	326	268 – 374
Sódio	552	423 – 778	355	251 – 439	82	44 – 128
Fósforo	2364	2044 – 3023	659	449 – 917	1577	910 – 2052
Ferro	9,80	7,76 – 12,98	2,67	1,54 – 3,87	5,29	3,82 – 8,18
Manganês	24,4	16,2 – 34,7	10,4	6,9 – 15,4	5,82	3,89 – 8,09
Estrôncio	1,37	0,96 – 2,12	0,20	0,04 – 0,35	0,69	0,43 – 0,96
Zinco	20,8	19,0 – 24,7	15,7	12,9 – 18,9	9,51	5,99 – 12,90

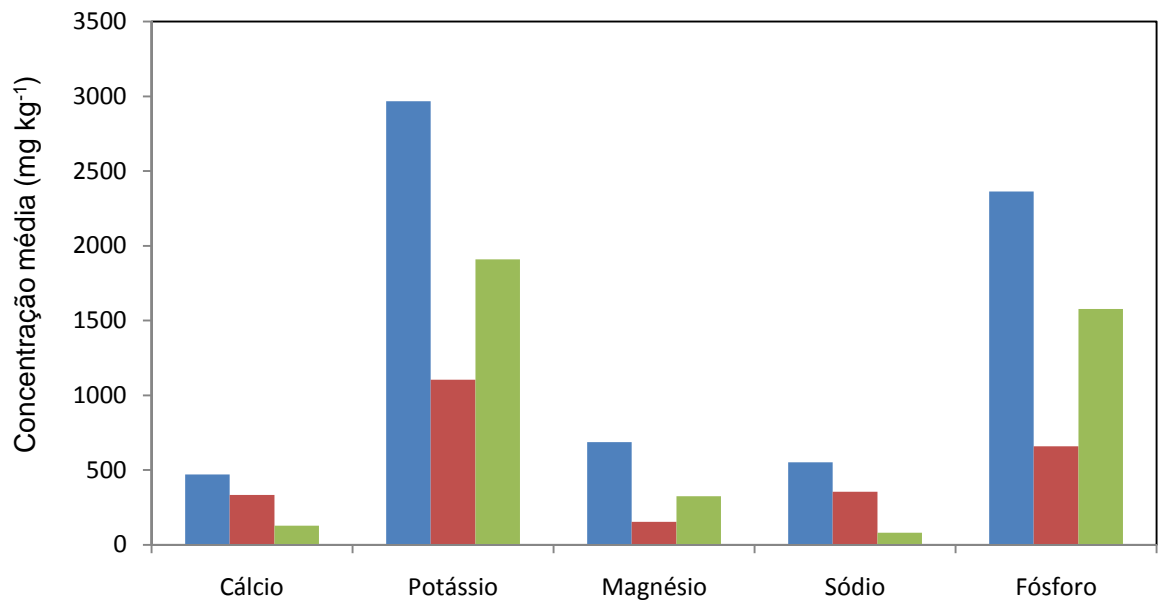


Figura 4.11: Concentração média (mg kg^{-1}) dos macronutrientes determinados em amostras de arroz integral (■), parboilizado (■) e branco (■).

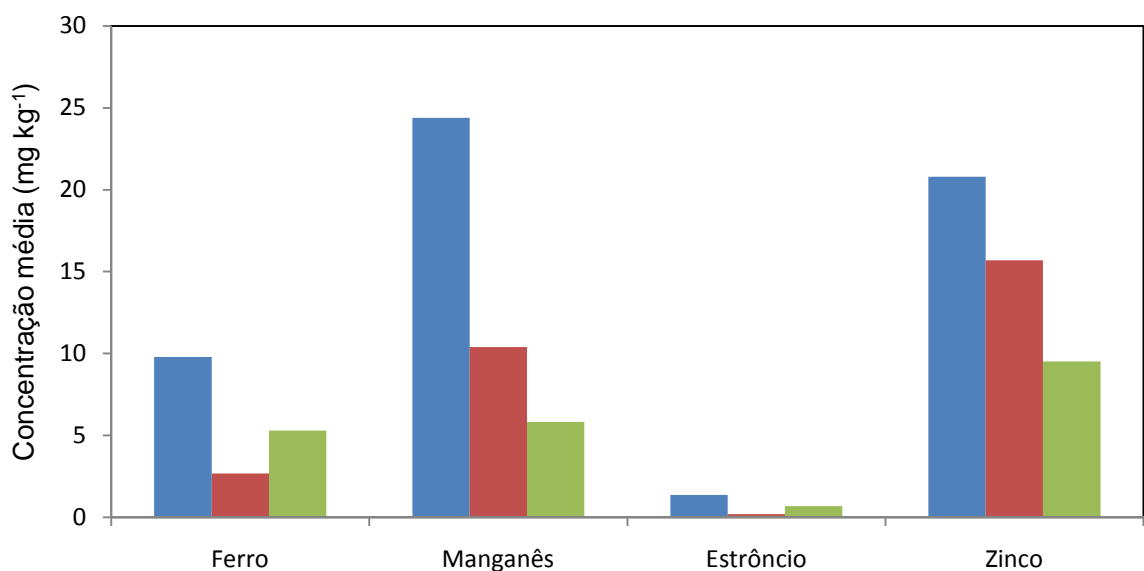


Figura 4.12: Concentração média (mg kg^{-1}) dos micronutrientes determinados em amostras de arroz integral (■), parboilizado (■) e branco (■)

4.7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Durante este trabalho foi possível desenvolver um método analítico simples e validado para determinar a composição mineral de amostras de arroz branco, parboilizado e integral coletadas na cidade de Salvador-BA em relação aos elementos (Ca, P, Mg, Mn, K, Na, Sr, Fe e Zn). O método foi validado mediante uso de material certificado de referência.

As técnicas de PCA e HCA mostraram que a composição mineral de amostras de arroz integral, arroz branco e parboilizado analisadas são estatisticamente diferentes.

A análise por componentes principais (PCA) mostrou que as amostras de arroz integral são mais ricas em minerais do que o arroz branco e parboilizado.

As concentrações de cálcio, sódio, zinco e manganês em arroz branco são maiores do que o arroz parcialmente cozido, enquanto que o arroz parboilizado tem maior teor de ferro, magnésio, estrôncio, potássio e fósforo.

As técnicas de PCA e HCA demonstraram também que a cocção do arroz provoca uma diminuição de cálcio, sódio, potássio, fósforo, ferro, manganês e zinco, exceto para estrôncio.

As concentrações de Ca, P, Mg, Mn, K, Na, Sr, Fe e Zn obtido nas amostras de arroz integral, parboilizado e branco analisados estão de acordo com dados relatados por outros autores.

- **Considerações finais**

Este trabalho possibilitou a determinação de espécies químicas em amostras de arroz utilizando diferentes procedimentos e empregando variadas técnicas analíticas.

A determinação de mercúrio utilizando o sistema automático MSFIA-CV-AFS, mostrou-se uma estratégia interessante, permitindo a utilização de poucos reagentes e com uma frequência analítica considerável.

A otimização multivariada com o planejamento Doehlert permitiu encontrar as melhores condições para a determinação de mercúrio utilizando um número reduzido de experimentos, diminuindo custo, tempo de preparo de soluções e de análise.

O procedimento avaliado apresentou boa exatidão e precisão, evidenciadas por bons percentuais de recuperação e pelo desvio padrão relativo sempre inferior a 10%. Somado a isso, foram alcançados baixos LD e LQ, coeficientes de correlação adequados e inexistência de efeito de matriz. Estes resultados indicam a viabilidade de aplicação do procedimento na determinação da concentração de mercúrio em amostras de arroz.

A possibilidade do uso da técnica de calibração externa com padrões aquosos na determinação de mercúrio nas amostras em questão, proporcionou uma maior simplicidade ao procedimento estabelecido, tornando-o apropriado para análises de rotina. As concentrações de mercúrio encontradas nas amostras de arroz comercializadas em Palma de Mallorca – Espanha, encontram-se abaixo do limite máximo permitido pela legislação responsável além de estarem concordantes com as concentrações reportadas na literatura.

Este trabalho mostrou ainda que, o emprego do alumínio como modificador químico permanente pode ser considerado uma excelente alternativa para a determinação de cádmio em amostras de arroz.

Comparando-se o alumínio com diferentes modificadores convencionais como o paládio e o fosfato de amônio, pode se dizer que o alumínio possui algumas vantagens como baixo custo e menores sinais de fundo. Além disso, a modificação permanente agiliza a análise, uma vez que o passo de adicionar o modificador químico para cada injeção da amostra é suprimido.

As temperaturas ótimas de pirólise e atomização obtidas com o modificador químico de alumínio mostraram-se adequadas, apresentando sempre maior sensibilidade. Assim, foi possível obter excelentes limites de detecção e quantificação para a determinação de cádmio em amostras de arroz. Isso pode ser atribuído à eficiência do alumínio, enquanto modificador, na volatilização do cádmio. Além disso, os experimentos realizados revelaram que amostras de arroz cru preliminarmente lavadas com água ultrapura apresentaram uma perda de cádmio inferior às amostras que, além de lavadas, foram cozidas.

As técnicas de PCA e HCA mostraram que a composição mineral de amostras de arroz integral, branco e parboilizado comercializados na cidade de Salvador-Ba são estatisticamente diferentes. Os resultados obtidos demonstraram também que a cocção do arroz provoca uma diminuição de cálcio, sódio, potássio, fósforo, ferro, manganês e zinco, exceto para estrôncio.

Este trabalho mostrou ainda que dentre os diferentes tipo de arroz analisados, a concentração mineral é maior em amostras de arroz integral.

As concentrações de Ca, P, Mg, Mn, K, Na, Sr, Fe e Zn obtido nas amostras de arroz integral, parboilizado e branco estão de acordo com dados relatados por outros autores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] VALLS R. M.; SOLER, A.; GIRONA, J.; HERAS, M.; ROMERO, M. P.; COVAS, M. I.; SOLÀ, R.; MASANA, L.; MOTILVA, M. J. J. Effect of the long-term regular intake of virgin olive oil on the phenolic metabolites in human fasting plasma. **Pharmaceut. Biomed.** v.53, p. 68-74, 2010.
- [2] SANCHO, A. I.; HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K.; ALESSANDRI, S.; CONTI, A.; GIUFFRIDA, M. G.; SHEWRY, P.; JENSEN, B. M.; SKOV, P.; VIETHS, S. Authentication of food allergen quality by physicochemical and immunological methods. **Clin. Exp. Allergy.** v.40, p. 973-986, 2010.
- [3] KÜSTERS, M.; BIMBER, U.; OSSENBRÜGGEN, A.; REESER, S.; GALLITZENDÖRFER, R.; GERHARTZ, M. Rapid and Simple Micromethod for the Simultaneous Determination of 3-MCPD and 3-MCPD Esters in Different Foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.58, p. 6570-6577, 2010.
- [4] MARCHIONI, D. M. L.; SLATER, B.; FISBERG, R. M. Aplicação das Dietary Reference Intakes na avaliação da ingestão de nutrientes para indivíduos. **Rev. Nutr., Campinas.** v. 17, p. 207-216, 2004.
- [5] Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl.- Campinas: NEPA-UNICAMP, p. 161, 2011.
- [6] WESENBERG D, KRAUSS GJ, SCHAUMLÖFFEL D. Metallo-thiolomics: Investigation of thiol peptide regulated metal homeostasis in plants and fungi by liquid chromatography–mass spectrometry. **Int J Mass Spectrom.** v. 307, p. 46–54, 2011.
- [7] LIU, R. H. Supplement quick fix fails to deliver (Invited article). **Food Technology International.** v.1, p. 71-72, 2002.

[8] KUSZNIEREWICZ, B.; SMIECHOWSKA, A.; BARTOSZEK, A.; NAMIESNIK J. The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage. **Food Chemistry**. v.108, p. 853-861, 2008.

[9] LOBO, A. S.; TRAMONTE, V. L. C. Efeitos da suplementação e da fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 17, p.107 -113, 2004.

[10] SANTOS, E. E.; LAURIA, D. C.; PORTO DA SILVEIRA; C. L.; Assessment of daily intake of trace elements due to consumption of foodstuffs by adult inhabitants of Rio de Janeiro city. **Sci. Total Environ.**, v. 327, p. 69-79, 2004.

[11] JULIATTI, M. A.; PRADO, R. M.; BARRIQUELO, M. F.; LENZI, E. Cádmiu em latossolo vermelho cultivado com milho em colunas: mobilidade e biodisponibilidade. **Rev. Bras. Cienc. Solo**, v. 26, p.1075-1081, 2002.

[12] ABRAHAMS, P. W. Soils: their implications to human health, **Sci. Total Environ.**, v.1-32, p. 291, 2002.

[13] HAMILTON, E. I. State of the art of trace element determinations in plant matrices: determination of the chemical elements in plant matrices, na overview. **Sci. Total Environ.** v. 176, p. 3-14, 1995.

[14] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. **FAOSTAT Database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acessado em: 10 de janeiro de 2012.

[15] INFOCOMM, Rice information. On-line. Disponível na internet:<<http://r0.unctad.org/infocomm/anglais/rice/docs/ia0710en.pdf> > Acesso em julho de 2012

[16] FAOSTAT – Food and agricultur organization of the united nations. Statistical databases, 2009. On line. Disponível na internet: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> > acesso em setembro de 2011.

[17] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2011/2012 a 2021/2022. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília:, 2012. 76 p.

[18] EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. ISSN 1679-8869 Versão eletrônica, junho de 2012. On line. Disponível na internet: < <http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/ArrozIrrigadoTocantis/index.htm> > Acesso em outubro de 2012.

[19] LOBO, Irene. Consumo de arroz cai 46% em 30 anos, revela pesquisa do IBGE. Brasil Agora. Agência Brasil. In: <http://www.radiobras.gov.br>. Acessado em: 19/12/2006.

[20] HAUBER GAMEIRO, G.; PEROZZI GAMEIRO, M. B. O consumo de arroz no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, p. 1043 -1066, 2008.

[21] JULIANO, B. O. Rice chemistry and quality, Island publishing house, Philippines, **Cap. 2: Structure and Gross Composition of the rice grain**, p. 25-54, 2003.

[22] JULIANO, B. O., BECHTEL, D. B. The rice grain and its gross composition. In: Juliano, B. O. (Ed.). **Rice: chemistry and technology**. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Cp. 2, p. 17-57, 1985.

[23] CAVALLERI, ADRIANO; MENDONCA JR, MILTON DE SOUZA; RODRIGUES, EVERTON NEI LOPES. Thrips species (Thysanoptera, Terebrantia) inhabiting irrigated rice and surrounding habitats in Cachoeirinha, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Rev. Bras. Entomol.** v. 54, 2010 .

[24] AMATO, G. W., ELIAS, M. C. **Parboilização do arroz**. Porto Alegre: Editora Ricardo Lens Ziede, p. 160, 2005

[25] BARATA, T. S. **Caracterização do consumo de arroz no Brasil: um estudo na Região Metropolitana de Porto Alegre**. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre: UFRGS/Cepan., p.93, 2005.

[26] ABIAP – Associação Brasileira de Arroz Parboilizado. Dados de 2007. On-line. Disponível na internet:< <http://www.abiap.com.br> > Acesso em novembro de 2012.

[27] CASTRO, E. DA M. DE; VIEIRA, N.R. DE A.; RABELO, R.R.; SILVA, S.A. DA. **Qualidade de grãos em arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 30, 1999

[28] CAI, T. S., LI, S. X. Sensitivity enhancement using nanometer silica particles on the surface of a quartz cell in mercury and selenium determination by vapor generation atomic absorption spectrometry. **Microchim. Acta**. v. 11, p. 171, 2010.

[29] TSALEV D. L. Hyphenated vapour generation atomic absorption spectrometric techniques. **Journal Anal. Atom. Spectrom.** v. 14, p.147, 1999.

[30] POHL, P. Recent advances in chemical vapour generation via reaction with sodium tetrahydroborate. **Trends Anal. Chem.** v.23, p. 21, 2004.

[31] POHL P., BROEKAERT J. A. C. Spectroscopic and analytical characteristics of an inductively coupled argon plasma combined with hydride generation with or without simultaneous introduction of the sample aerosol for optical emission spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 398, p. 537, 2010.

[32] POHL, P. Hydride generation - recent advances in atomic emission spectrometry. **Trac-Trends in Anal. Chem.** v. 23, p. 87, 2004.

[33] GUO, T. Z., LIU, M. Z., SCHRADER, W. Use of a flow-injection hydride generation technique in non dispersive atomic fluorescence spectrometry. **J. Anal. Atom. Spectrom.** v.7, p. 667, 1992.

[34] GUO, X. W. Automatic determination of mercury, arsenic, and other hydride-forming elements by atomic-fluorescence spectrometry. **Laboratory Robotics and Automation.** v. 12, p. 67-73, 2000.

[35] ROJAS, L., MORILLO, M., CARRIÓN, N., CHIRINOS, J. Investigation of the direct hydride generation nebulizer for the determination of arsenic, antimony and selenium in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 376, p. 110, 2003.

[36] LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; QUEVAUVILLER, P.; HORVAT, M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry.** v. 24, p. 383-393, 2005.

[37] FERREIRA, S. L. C.; MIRO, M.; DA SILVA, E. G. P.; MATOS, G. D.; DOS REIS, P. S.; BRANDAO, G. C.; DOS SANTOS, W. N. L.; DUARTE, A. T.; VALE, M. G. R.; ARAUJO, R. G. O. Slurry Sampling-An Analytical Strategy for the Determination of Metals and Metalloids by Spectroanalytical Techniques. **Applied Spectroscopy Reviews.** v.45, p. 44-62, 2010.

[38] REYES, L. H.; MAR, J. L. G.; HERNANDEZ-RAMIREZ, A.; PERALTA-HERNANDEZ, J. M.; PERALTA-HERNANDEZ, J.; BARBOSA, J. M. A.; KINGSTON, H. M. S. Microwave assisted extraction for mercury speciation analysis. **Microchimica Acta.** v. 172, p. 3-14, 2011.

[39] STOCKWELL, P.B., CORNS W.T. Environmental Sensors Based on Atomic Fluorescence. **Analyst.** v. 119, p.1641, 1994.

[40] FLORES, E. M. M.; WELZ, B.; CURTIUS, A. J. Determination of mercury in mineral coal using cold vapor generation directly from slurries, trapping in a graphite

tube, and electrothermal atomization. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 56, p. 1605-1614, 2001.

[41] AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do mercúrio**. Rima Editora, São Carlos, Brasil, 2003.

[42] GRAEME, A. K.; POLLACK, C. V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. **The Journal of Emergency Medicine**. v. 16, p. 45-56, 1998.

[43] KUMAR, M.; SHARMA, M. K.; KUMAR, A. *Spirulina fusiformi*: A food supplement against mercury induced hepatic toxicity. **J. Health Sci**. v. 51, p. 424 – 430, 2005.

[44] KLAASSEN, C. D. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In HARDMAN, J. G.; GIMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. (Eds). Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill. Chapter v. 66, p. 1649-1671, 1996.

[45] MICARONI, R. C. DA C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. DE F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, 2000.

[46] YALLOUZ, A.; CAMPOS, R. C.; LOUZADA, A. Níveis de mercúrio em atum sólido enlatado comercializado na cidade do Rio de Janeiro. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 21, n. 1, p. 1-4, 2001.

[47] FAO/WHO (1978) Evaluation of certain food additives and contaminants. Twenty second report of the Joint Expert Committee on Food Additives. World Health Organization, Geneva, WHO Technical Report Series no. 631.

[48] DA SILVA, A. F.; DIAS, L. F.; SAINT'PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B. Determination of Hg and Tl in environmental reference materials using slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry

with permanganate as modifier and calibration against aqueous Standards. **Journal of analytical atomic spectrometry**. v.18, p. 344-349, 2003.

[49] LI, L.; WANG, F.; MENG, B.; LEMES, M.; FENG, X.; JIANG, G. Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area. **Environmental Pollution**. v. 158, p. 3103-3107, 2010.

[50] QUI, G.; FENG, X.; LI, P.; WANG, S.; LI, H.; SHANG, L.; FU, X. Methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) grown at abandoned mercury mines in Guizhou, China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 2465-2468, 2008.

[51] SILVA, L. O. B.; DA SILVA, D. G.; LEÃO, D. J.; MATOS, G. D.; FERREIRA, S. L. C. Slurry sampling for the determinations of mercury in Rice using cold vapor atomic absorption spectrometry. **Food Analytical. Methods**, v. 5, p. 1289-1295, 2012.

[52] ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; COLLINS, C. H. Classificação e definição dos métodos de análises em fluxo (Recomendações – IUPAC 1994). **Química Nova**. v. 22, p. 143-146, 1999.

[53] CERDÀ, V. Introducción a los métodos de análise en flujo. **Sciware. S. L.** Palma de Mallorca, 2006.

[54] ALBERTUS, F.; HORSTKOTTE, B.; CLADERA, A.; CERDÀ, V. A robust multisyringe system for process flow analysis - Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. **The Analyst**. v. 124, p.1373-1381, 1999.

[55] PONS, C.; FORTEZA, R.; CERDÀ, V. Multi-pumping flowsystem for the determination, solidphase extraction and speciation analysis of iron. **Analytica Chimica Acta**. v. 550, p. 33-39, 2005.

-
- [56] CERDÀ, V.; ESTELA, J. M.; FORTEZA, R.; CLADERA, A.; BECERRA, E.; ALTIMIRA, P.; SITJAR, P. Flow techniques in water analysis. **Talanta**. v. 50, p. 695-705, 1999.
- [57] VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística Experimental**. São Paulo. Atlas S/A. 1989.
- [58] TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**. v. 29, p. 338-350, 2006.
- [59] MORITA, H.; TANAKA, H.; SHIMOMURA, S. Atomic fluorescence spectrometry of mercury: principles and developments. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 50, p. 69-84, 1995.
- [60] REIS, B. F.; RÓDENAS-TORRALBA, E. SANCENÓN-BULEO, J.; MORALES-RUBIO, A.; LA GUARDIA, M. de. Multicommutation cold vapour atomic fluorescence determination of Hg in water. **Talanta**. v. 60, p. 809-819, 2003.
- [61] REIS, B. F.; RÓDENAS-TORRALBA, E. SANCENÓN-BULEO, J.; MORALES-RUBIO, A.; LA GUARDIA, M. de. Improvement of the atomic fluorescence determination of mercury by using multicommutation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 17, p. 537-540, 2002.
- [62] LEAL, L.O.; ELSHOLZ, O.; FORTEZA, R.; CERDÀ, V. Determination of mercury by multisyringe flow injection system with cold-vapor atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v.573-574, p. 399-405, 2006.
- [63] GALLIGNANI, M.; BAHASAS, H.; BRUNETTO, M. R.; BURGUERA, M.; BURGUESA, J. L.; DE PENA, Y. P. A time-based flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pre-treatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. **Analytica Chimica Acta**. v. 369, p. 57-67, 1998.

[64] CORREIA, P. R. M.; OLIVEIRA, P. V.; NETO, J. A. G.; NÓBREGA, J. A.; Silver as internal standard for simultaneous determination of Cd and Pb in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 19, p. 917-922, 2004.

[65] MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Estatística para química analítica. 2ª ed. Delaware, E.U.A., Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., p. 214 1993.

[66] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. 5ª ed. New York: Saunders College Publishing. 1998.

[67] BRASIL - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. **Adota o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre critérios para validação de métodos analíticos**. Instrução Normativa, nº46 de 10 de jun. 2003. Diário Oficial da União. Brasília, 11 de jun. de 2003.

[68] THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**. v. 74, p. 835-855, 2002.

[69] DOS SANTOS, W. N. L., SANTOS, C. M. C., FERREIRA, S. L. C., Application, of three variables Doehlert matrix for optimisation of an on-line pre-concentration system for zinc determination in natural water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**. v.75, p. 211–221, 2003.

[70] JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2003. Summary and conclusions of the sixtyfirst meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), p. 18-22. Available on <http://www.who.int/pcs/jecfa/Summary61.pdf>.

[71] SLAVIN, W. A comparison of atomic spectroscopy analytical techniques. **International Journal of Spectroscopy**. v. 4, p. 22-27, 1992.

[72] STURGEON, R. E. Atomic absorption spectroscopy – Present and future aspects. **Analyst**. v. 117 p. 233-236, 1992.

[73] D'HAESE, P. C., LAMBERTS, L. V., VANHUELE, A. O. DE BROE, M. E. Direct Determination of Zinc in Serum by Zeeman Atomic Absorption Spectrometry with a Graphite Furnace. **Clinical Chemistry**. v. 38, p. 2439-2443, 1992.

[74] NRIAGU, J. O. Cadmium in the aquatic environmental. *In*. **Advances in Environmental Science and Tecnology**. New York: John Wiley & Sons, 1987. 272p.

[75] HERNÁNDEZ-CARABALLO, E. A., BURGUERA M., BURGUERA J. L., Determination of cadmium in urine specimens by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a fast atomization program. **Talanta**. v. 63 p. 419–424, 2004.

[76] BIRD, C. Química Ambiental. **Bookman**, São Paulo. 2006.

[77] ANGERER, J. Cadmium. *In*: ANGERER, J.; SCHALLER, K. H (Eds). Analysis of hazardous substances in biological materials. **VCH Weinheim**. v. 2, p. 85-96, 1988.

[78] SNELL, F. D.; ETTRE, L. S. Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis. **Interscience Publishers**, New York, 1970.

[79] SNELL, F. D.; ETTRE, L. S. Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis. **Interscience Publishers**, New York, 1970.

[80] WHO. World Health Organization. Air Quality Guidelines. 2 ed. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000. Disponível em: <http://www.euro.who.int/document/aiq/6_3cadmium.pdf>http://www.euro.who.int/document/aiq/6_7lead.pdf.> Acesso em: 04 nov. 2011.

[81] PAULUS, J.; RYDZYNSKI, K.; DZIUBALTOWSKA, E.; WYSZYNSKA, K.; NATARAJAN, A. T.; NILSSON, R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 540, p. 19-28, 2003.

[82] TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo baiano. **Química Nova**, v. 15, p. 147-154, 1992.

[83] OMS - Organização Mundial de Saúde. Elementos traço na nutrição e saúde humanas. São Paulo: Roca, p. 297, 1998.

[84] VOLYNSKII, A. B., Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **J. Anal. Chem.**, v. 58, p. 905-921, 2003.

[85] DOS SANTOS, L. M. G.; ARAUJO, R. G. O.; WELZ, B.; JACOB, S. D. C.; VALE, M. G. R.; BECKER-ROSS, H. Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 78, p. 577-583, 2009

[86] R. E. Rivas, I. Lopez-Garcia and M. Hernandez-Cordobo, Microextraction based on solidification of a floating organic drop followed by electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of ultratraces of lead and cadmium in waters. **Analytical Methods**. v. 2, 225-230, 2010.

[87] SILVA, J. A. S.; CHAVES, E. S.; SANTOS, E. J.; SAINT'PIERRE, T.D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS A. J. Calibration techniques and modifiers for the determination of Cd, Pb and Tl in biodiesel as microemulsion by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21, p. 620-626, 2010.

[88] LOBO, F. A.; GOVEIA, D.; OLIVEIRA, A. P.; ROMAO, L. P. C.; FRACETO, L. F.; DIAS, N. L.; ROSA, A. H. Development of a method to determine Ni and Cd in

biodiesel by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Fuel**. v. 90, p. 142-146, 2011.

[89] DOBROWOLSKI, R.; ADAMCZYK, A.; OTTO, M. Comparison of action of mixed permanent chemical modifiers for cadmium and lead determination in sediments and soils by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 82, p. 1325-1331, 2010.

[90] DOCEKALOVA, H.; DOCEKAL, B.; KOMAREK, J.; NOVOTNY, I. Determination of selenium by graphite furnace a.a.s. Part I. Chemical modifiers. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 6, p. 661-668, 1991.

[91] Matsusaki, K., Harada, V. Determination of antimony by electrothermal atomic absorption spectrometry used chemical modifiers. **Bunseki Kagaku**. 41, n. 3, p. 109-114, 1992. -

[92] MATSUSAKI, K; SATA, T. Removal of sulfate interference in the determination of indium and gallium by graphite furnace AAS. **Bunseki Kagaku**. v. 43, n 8, p. 641-643, 1994

[93] TSAI, S. J. J.; SHIUE, C. C.; CHANG, S. I. Electrothermal atomic-absorption spectrometric determination of copper in nickel-base alloys with various chemical modifiers. **Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy**. v. 52, p. 1497-1508, 1997.

[94] TSAI, S. J. J.; SHIUE, C. C.; CHANG, S. I. Silver and lanthanum as effective modifiers in trace determination of cadmium in nickel-base alloys by electrothermal atomic-absorption spectrometry. **Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy**. v. 52, p. 55-65, 1997.

[95] MA, D.; OKAMOTO, Y.; KUMAMARU, T.; IWAMOTO, E. Determination of gallium by graphite furnace atomic absorption spectrometry with combined use of a tungsten-coated L'vov platform tube and a chemical modification technique. **Analytica Chimica Acta**. v. 390, p. 201-206, 1999.

[96] DONER, G.; AKMAN, S. Modifier effect of aluminum sulfate on the zinc determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Annali Di Chimica**. v. 90, p. 489-495, 2000.

[97] DONER, G.; AKMAN, S. A Comparison of Sample Preparation Procedures for the Determination of Iron and Zinc in Bulgur Wheat by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Letters**. v. 33, p. 3333-3341, 2000.

[98] Wang, X.P; Li, B. Analysis of 27 Mineral Elements in the Rice Samples Collected from China and Japan by Using ICP-OES and ICP-MS. **Spectroscopy and spectral analysis**. v. 30, p. 2260 – 2264, 2010.

[99] CARRION, N.; ITRIAGO, A. M.; ALVAREZ, M. A.; ELJURI, E. Simultaneous determination of lead, nickel, tin and copper in aluminium-base alloys using slurry sampling by electrical discharge and multielement ETAAS. **Talanta**. v. 61, p. 621-632, 2003.

[100] CARRION, N.; ITRIAGO, A. M.; ALVAREZ, M. A.; ELJURI, E. Simultaneous determination of lead, nickel, tin and copper in aluminium-base alloys using slurry sampling by electrical discharge and multielement ETAAS. **Talanta**. v. 61, p. 621-632, 2003.

[101] INCE, H.; AKMAN, S. The Interference Effect of a Mixture of Magnesium, Aluminium, Sulfate and Chloride on the Atomization and Vaporization of Manganese in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Sciences**. v. 20, p. 695-699, 2004.

-
- [102] FERREIRA, S.L.C.; PORTUGAL, L.A.; MATOS, G.D.; DA SILVA, D.G.; DE JESUS, R.M.; BRITO, G.B. Aluminium as chemical modifier for the determination of lead in sugar cane spirits using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**. v. 3, p. 1168-1171, 2011
- [103] WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, R. Palladium-nitrate-magnesium nitrate modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Part 5: Performance for the Determination of 21 Elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 7, p. 1257-1271, 1992.
- [104] LIMA, E. C.; BRASIL, J. L.; VAGHETTU, J. C. P. Evaluation of different permanent modifiers for the determination of arsenic in environmental samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 60, p. 103-113, 2003.
- [105] WELZ, B. Atomic Absorption Spectrometry. 2nd ed., Springer Verlag, Weinheim, 1985.
- [106] VOLYNSKY, A. B. Application of graphite tubes modified with high-melting carbides in electrothermal atomic absorption spectrometry. I. General approach. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 53, p. 509-535, 1998.
- [107] MICHAELIS, M. R. A. Tantalum carbide coated platforms for atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization: performance characteristics for tin, selenium and rhodium. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 3, p. 503-509, 1988.
- [108] VOLYNSKII, A. B., Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 58, p. 905-921, 2003.
- [109] L'VOV, B. V.; NOKOLAEV, V.G.; NORMAN, E.A.; POLZIK, L.K.; MOJICA, M. Theoretical of the characteristic mass in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 4, n. 10. p. 1043-1053, 1996.

-
- [110] WAHAB, H. S.; CHAKRABARTI, C. L. Studies on the sensitivity of yttrium by electrothermal atomization from metallic and metal-carbide surfaces of a heated graphite atomizer in atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 36, n. 5. p. 463-474, 1981.
- [111] LIMA, E. C.; BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P. Evaluation of different permanent modifiers for the determination of arsenic in environmental samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 60, p. 103-113, 2003.
- [112] TSALEV, D. L.; SLAVEYKOVA, V. I. Chemical modification in electrothermal atomic absorption spectrometry. Organization and classification of data by multivariate methods. Invited lecture. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 7, p. 147-153, 1992.
- [113] WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. Wiley-VCH, 1999.
- [114] ORTNER, H. M.; Birzer, W.; Welz, B.; Schlemmer, G.; Curtius, J. A.; Wegscheider, W.; Sychra, V. Surface and materials of electrothermal atomic absorption spectrometry- more than a merely morphological study. **Zeitschrift Fresenius für Chemie Analytische**. v. 323, p. 681-688, 1986.
- [115] LIAO, Y. P.; HAUG, H. O. Investigation of suitable coatings for in situ trapping of Se and Te in flow-injection hydride generation and graphite furnace atomic absorption spectrometry for automated determination. **Microchemical Journal**. v. 56, p. 247-258, 1997.
- [116] RODRIGUEZ, J. C. G.; BARIELA J. G.; HERRERO, C. L.; FREIRE, M. R. S.; GARCIA, S. M.; PENA, R. M. C. Comparison of Palladium-magnesium nitrate and ammonium dihydrogenphosphate modifiers for cadmium determination in honey samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 61, p. 509-517, 2003.

[117] Volynskii, A. B. Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**. v 58, 905-921, 2003.

[118] FEUERSTEIN, M.; SCHLEMMER, G. Determination of se in human serum by gfaas with transversely heated graphite atomizer and longitudinal zeeman-effect background correction. v. 20, n. 5. **Atomic spectroscopy journal**. p. 180-185, 1999.

[119] ORTNER, H. M.; BULSKA, E.; ROHR, U.; SCHLEMMER, G.; WEINBRUSH, S.; WELZ, B. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry-mechanisms of action (A tutorial review). **SPECTROCHIMICA ACTA**, 57, p. 1835-1853. 2002.

[120] VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de Métodos Analíticos. **Arquivos do Mudi**. v. 11, n 2, p. 26-31, 2007.

[121] EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2007.

[122] ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos. Resolução – RE no 899, de 29 de maio de 2003.

[123] IUPAC Analytical Chemistry Division, **Spectrochimica Acta Part B**. v 33, p. 242, 1978.

[124] PEREIRA, L. A.; AMORIM, I. G.; SILVA, J. B. B.; Development of methodologies to determine aluminum, cadmium, chromium and lead in drinking water by ET AAS using permanent modifiers. **Talanta**. v. 64, p. 395, 2004.

[125] PEREIRA, L.A.; BORGES, S.S. de O.; CASTRO, M. C., NETO, W.B., WINDMÖLLER, C.C.; da SILVA, J.B.B. Determination of manganese and nickel in slurry sampling by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 86, n. 4, p. 312–316, 2008.

[126] BOBROWSKA-GRZESIK, E., A. JAKOBIK-KOLON. Leaching of cadmium and lead from dried fruits and fruit teas to infusions and decoctions, **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 326-331, 2008

[127] ACAR, O. Molybdenum, Mo–Ir and Mo–Ru coatings as permanent chemical modifiers for the determination of cadmium and lead in sediments and soil samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 542, p. 280-286, 2005.

[128] WELZ, B.; SPERLING, M. "Atomic Absorption Spectrometry" 3 Ed, Wiley-VHC, Germany, 1999.

[129] ACAR, O. Evaluation of V, Ir, Ru, V–Ir, V–Ru, and W–V as permanent chemical modifiers for the determination of cadmium, lead, and zinc in botanic and biological slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**., v. 545, p. 244-251, 2005

[130] DOS SANTOS, L. M. G.; ARAUJO, R. G. O.; WELZ, B.; JACOB, S. D. C.; M. VALE, G. R.; BECKER-ROSS, H. Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**. v. 78, p. 577-583, 2009.

[131] CHAVES, E. S.; SANTOS, E. J.; SAINT'PIERRE, T. D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Calibration techniques and modifiers for the determination of Cd, Pb and Tl in biodiesel as microemulsion by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 21, p. 620-626, 2010.

[132] KORN, M. G. A.; DOS SANTOS, G. L.; ROSA, S. M., TEIXEIRA, L. S. G.; DE OLIVEIRA, P. V. Determination of cadmium and lead in Cetacean Dolphinidae tissue from the coast of Bahia state in Brazil by GFAAS. *Microchemical Journal*. V. 12, p. 96, 2010.

-
- [133] SILVA, P.T, LOPES, M. L. M.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Efeito de diferentes processamentos sobre o teor de ácido ascórbico em suco de laranja utilizado na elaboração de bolo, pudim e geléia. **Cienc Tecnologic Aliments**. v. 26, n 3, p. 678-82. 2006.
- [134] CUPPARI, L.; AMANCIO, O. M. S.; NÓBREGA, M.; SABBAGA, E. Preparo de vegetais para utilização em dieta restrita em potássio. *Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr*. v. 28, p. 1-7, 2004.
- [135] BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. *Quimica. Nova*, v.8, p.84-99, 1985.
- [136] FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.
- [137] VALDERRAMA, P. Avaliação de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em Indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo. 2005. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – UNICAMP, Campinas, 2005.
- [138] BEEBE, K.; PELL, R.; SEAHOLTES, N. B. *Chemometric: A practical guide*. Ed. John Wiley and Sons, New York, 1998.
- [139] SMOLINSKI, A., WALCZAK, B., EINAX, J. Hierarchical clustering extended with visual complements for interpretation of environmental data set. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 64, p. 45-54, 2002.
- [140] JOLLIFFE, I. T. *Principal component analysis*. 2 ed. New York. **Springer**, 2002.
- [141] ALAM, T. M.; ALAM, M. K. “Chemometrics analysis of nuclear magnetic resonance spectroscopy data”. **Spectroscopy**. v. 16, p. 19, 2001.

-
- [142] BRESCIA, M. A.; CALDAROLA, V.; De GIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F. P.; SACCO, A. "Characterization of geographical origin of Italian red wines base don traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations". **Analytica Chimica Acta**. v. 458, p. 177, 2002.
- [143] MAGKOS, F.; ARVANITI, F.; ZAMPELAS, A. "Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature." **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 46, p. 23-56, 2006.
- [144] KOWALSKI, B. R.; BENDER, C. F.; "Pattern recognition a powerfull approach to interpreting chemical data". *Journal of the American Chemical Society*. v. 94: p. 5632-5639, 1972.
- [145] MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. "Characterization of Green coffees varieties according to their metal content". **Analytica Chimica Acta**. v. 358, p. 177–183, 1998.
- [146] CHARLTON, A. J.; FARRINGTON, W. H. H.; BRERETON, P. "Application of 1H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity of instant coffee". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50: p. 3098-3103, 2002.
- [147] MARCOS, A.; FISHER, A.; REA, G.; HILL, S. J. "Preliminary study using trace element concentrations and chemometrics approach to determine the geographical origin of tea". **J. Anal. Atomic. Spectrom.**, v. 13: p. 521, 1998.
- [148] FERNANDÉZ-CÁCERES, P. L.; MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. "Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical oringin according to their metal conten." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v. 49, p. 4775-4779, 2001.

[149] SPERKOVÁ, J.; SUCHÁNEK, M. "Multivariate classification of wines from different Bohemian regions (Czech Republic)". **Food Chemistry**. v. 93, p. 659- 663, 2005.

[150] TAYLOR, V. F.; LONGERICH, H. P.; GREENOUGH, J. D. "Multielement analysis of Canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS) and multivariate statistics." **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 51, p. 856, 2003.

[151] ZEINER, M.; STEFFAN, I.; CONDRIĆ, I. J. Determination of trace elements in olive oil by ICP-AES and ETA-AAS: a pilot study on the geographical characterization. **Microchemical Journal**. v. 81, p. 171-176, 2005.

[152] BELTON, P. S.; COLQUHOUN, I. J.; KEMSLEY, E. K.; DELGADILHO, I.; ROMA, P.; DENNIS, M. J.; SHARMAN, M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; SPRAUL, M. Application of chemometrics to the ¹H spectra of apple juices: discrimination between apples varieties. **Food Chemistry**. v. 61, p. 207-213, 1998.

[153] SKRBIC, B.; DURISIC-MLADENOVIC, N.; CVEJANOV, J. Principal component analysis of trace elements in Serbian wheat. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 53, p. 2171, 2005.

[154] SACCO, A.; BOLSI, I. N.; MASSINI, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GHELLI, S. "Preliminary Investigation on the characterization of durum wheat flours coming from some areas of South Italy by means of ¹H high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance". **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 46, p. 4242, 1998.

[155] BRERETON, R. G. Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons, New York, 2002.

[156] MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLES, A. G. Characterization of arábica and obusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content. **Food Chemistry**. v. 66, p. 365, 1999.

[157] MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLES, A. G. Application of pattern recognition to the discrimination of roasted coffees. **Analytical Chimica Acta**. v. 320, p.191, 1996.

[158] ANDERSON, K. A.; SMITH, B. W. Chemical profiling to differentiate geographic growing origins of coffee. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.50, p. 2068, 2002.

[159] DOS SANTOS, E. J.; DE OLIVEIRA, E. Determination of mineral nutrients and toxic elements in Brazilian soluble coffee by ICP AES. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 14, p. 523-531, 2001.

[160] DOS SANTOS, J.; DOS SANTOS, M. L. P.; CONTIA, M. M. Comparative Study of Metal Contents in Brazilian Coffees Cultivated by Conventional and Organic Agriculture Applying Principal Component Analysis. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 21, p. 1468-1476, 2010.

[161] ANDERSON, K. A.; MAGNUSON, B. A.; TSCHIRGI, M. L.; SMITH B. Determining the geographic origin of potatoes with trace metal analysis using statistical and neural network classifiers. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.47, p. 1568, 1999.

[162] KOLASANI, A., XU, H. & MILLIKAN, M. Evaluation of mineral content of Chinese medicinal herbs used to improve kidney function with chemometrics. **Food Chemistry**. v. 127, p. 1465-1471, 2011.

[163] PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; DOWNEY, G.; RAWSON, A.; WARRINER, K., GERNIGON, G. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify fruits and vegetables commonly consumed in Ireland based on in vitro

antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 24, p. 250-256, 2011.

[164] FADIGAS, J. C.; SANTOS, A. M. P.; JESUS, R. M.; LIMA, D. C.; FRAGOSO, W. D.; DAVID, J. M.; FERREIRA, S. L. C. Use of multivariate analysis techniques for the characterization of analytical results for the determination of the mineral composition of kale. **Microchemical Journal**. v. 96, p. 352-356, 2010.

[165] FROES, R. E. S.; NETO, W. B.; SILVA, N. O. C.; NAVEIRA, R. L. P.; NASCENTES, C. C., SILVA, J. B. B. Multivariate optimization by exploratory analysis applied to the determination of microelements in fruit juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy**. v. 64, p. 619-622, 2009.

[166] TORMEN, L.; TORRES, D. P.; DITTERT, I. M., ARAÚJO, R. G. O., FRESCURA., V. L. A., CURTIUS, A. J. Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. **Journal of food composition and analysis**. v. 24, p. 95-102, 2011.

[167] FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A; NOGUEIRA, A. R. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. **Eclética Química**. v. 27, 1, 2002.

[168] CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Optimization of the Benzo(A)Pyrene Determination Procedure in Cachaça. **Journal Brazilian Chemical Society**. v 20, p. 502, 2009.

[169] CESARINO, I.; MARINO, G.; MATOS, J. D.; CAVALHEIRO, E. T. G. Evaluation of a carbon paste electrode modified with organofunctionalised SBA-15 nanostructured silica in the simultaneous determination of divalent lead, copper and mercury ions. **Talanta**. v. 75, p. 15-21, 2008.

-
- [170] NASCIMENTO, F. R.; BEZERRA, C. W. B.; FURUYA, S. M. B.; SCHULTZ M. S.; POLASTRO, L. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Mineral profile of Brazilian cachaças and other international spirits. **Journal of food composition and analysis**. v.12, p. 17, 1999.
- [171] FALAHI, E.; HEDAIATI, R.; GHIASVAND, A.R. Survey of iron, zinc, calcium, copper, lead, and cadmium in rice samples grown in Iran. **Food Addit Contam B**. v. 3, p.80 – 83, 2010.
- [172] PARENGAM, M.; K. JUDPRASONG, S.; SRIANUJATA, S.; JITTINANDANA, S. LAOHAROJANAPHAND.; BUSAMONGKO, A. Study of nutrients and toxic minerals in rice and legumes by instrumental neutron activation analysis and graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. **Journal of food composition and analysis**. v. 23, p.340 – 345, 2010.
- [173]GONZALVEZ, A.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Geographical traceability of “Arròs de Valencia” rice grain based on mineral element composition. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1254 – 1260, 2011.
- [174] ZUBAIR, M.; ANWAR, F.; ALI S.; IQBAL, T. Proximate Composition and Minerals Profile of Selected Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties of Pakistan. **Asian Journal of Chemistry**. v. 24, p. 417 – 421, 2012
- [175] BATISTA, B.L.; SOUZA, V.C O; DA SILVA, F.G.; BARBOSA, F. Survey of 13 trace elements of toxic and nutritional significance in rice from Brazil and exposure assessment. **Food Addit Contam B**. v. 3, p. 253 – 262, 2010
- [176] HUANG, J.H.; ILGEN, G. P.; FECHER, J. Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**. v. 25, p. 800 – 802, 2010.

[177] DA SILVA, M.J.; PAIM, A.P.S.; PIMENTEL, M.F.; CERVERA, M.L.; LA GUARDIA, M. Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. **Analytical Chimica Acta**. v. 667, p. 43 – 48, 2010.

[178] BATISTA, B.L.; SOUZA, J.M.O.; DE SOUZA, S.S.; BARBOSA, HAZARD, F.; MATER, J. Evaluation of the Concentration of Nonessential and Essential Elements in Chicken, Pork, and Beef Samples Produced in Brazil . **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. v. 191 p. 342 – 348, 2011.

[179] DA SILVA, D.G.; SILVA, M. M.; SILVA, L.O.B.; PORTUGAL, L.A.; MATOS G.D.; FERREIRA, S.L.C. Determination of cadmium in rice by electrothermal atomic absorption spectrometry using aluminium as permanent modifier. **Analytical Methods**.v. 3, p. 2495 – 2500, 2011.